



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Biología

TESIS DOCTORAL

El gen *homothorax* y el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*

Walter Cantero Morales

Madrid, 2013

Memoria presentada por Walter Cantero Morales para optar al grado de Doctor en Biología, dentro del programa de doctorado de Genética y Biología Celular, por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO).

Director de tesis: Dra. Natalia Azpiazu Torres

Tutor: Dr. Carlos Sentís Castaño

Madrid, 2013

1-RESUMEN.....	7
2-INTRODUCCIÓN.....	11
2.1. La biología del desarrollo y <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo.....	13
2.2. La cromatina nuclear, su composición y estructura.....	19
2.3. La epigenética y el proceso de formación de heterocromatina en <i>Drosophila melanogaster</i>	23
2.4. El gen <i>homothorax</i> : un gen complejo.....	30
3-OBJETIVOS.....	35
4-RESULTADOS.....	39
4.1. Estudio del fenotipo de incorrecta formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de <i>D. melanogaster</i> en ausencia del factor de transcripción Homothorax.....	41
4.1.1. Análisis del incremento del daño, las roturas y la fragmentación del ADN nuclear de los embriones en ausencia de Homothorax.....	41
4.1.2. Estudio del estado del ADN ribosómico en embriones desarrollados en ausencia de Hth.....	44
4.1.3. Ensayo de accesibilidad de la DNasa I para la determinación del estado estructural de la heterocromatina en los embriones de <i>Drosophila melanogaster</i> desarrollados en ausencia de Hth.....	47
4.2. Caracterización del estado de la ruta de modificación de histonas en embriones de <i>Drosophila melanogaster</i> desarrollados en ausencia del factor de transcripción Homothorax.....	50

4.2.1. El proceso de reemplazo de la histona H2 por su variante H2Av en ausencia de Hth.....	50
4.2.2. El proceso de acetilación del H4K12 en ausencia de Hth.....	52
4.2.3. El proceso de metilación del H3K9 en ausencia de Hth.....	55
4.3. Análisis de la función molecular del factor de transcripción Homothorax en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de <i>Drosophila melanogaster</i>	64
4.3.1. Análisis <i>in silico</i> de secuencias de unión a ADN del factor de transcripción Hth en las regiones de heterocromatina centromérica y pericentromérica.....	65
4.3.2. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (CHIPs) de regiones de heterocromatina constitutiva.....	68
4.3.3. Cuantificación de la expresión de los ARNs transcritos de secuencias satélites en el embrión de <i>D. melanogaster</i>	69
5-DISCUSIÓN.....	73
6-CONCLUSIONES.....	85
7-APÉNDICE METODOLÓGICO.....	91
8-APÉNDICE BIBLIOGRÁFICO.....	105
9-COMPENDIO DE ABREVIATURAS.....	123

1-RESUMEN

El trabajo aquí presentado se centra en el estudio de la implicación del gen *homothorax* en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Previamente ha sido descrita una función del componente materno de *hth* en el acoplamiento de la heterocromatina centromérica durante el desarrollo temprano del embrión de *D. melanogaster* (Salvany, 2009). Hth estaría facilitando la transcripción de secuencias de ADN satélite repetido de origen centromérico por la ARN polimerasa II. Los transcritos de estas secuencias serían necesarios para el correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica (Salvany, 2009).

En este trabajo se ha comprobado que los embriones que se desarrollan en ausencia de Hth muestran fenotipos similares y comparables a los que presentan los embriones que poseen alterada alguna etapa del proceso de formación de heterocromatina. Los embriones se caracterizan por la presencia de fragmentos de ADN dispersos en el citosol sincitial y además, en ausencia del factor de transcripción Homothorax, las roturas y el daño en el ADN nuclear se ven incrementados. En adición, los núcleos de los embriones desarrollados en ausencia de Hth muestran desorganización nucleolar y descondensación del ADN ribosómico.

La ruta de modificación de histonas encargada de constituir el proceso de formación de la heterocromatina en *D. melanogaster* se encuentra alterada. La trimetilación del residuo 9 de lisina de la histona H3 no se lleva a cabo correctamente. A su vez, la dimetilación del H3K9 se acumula en los núcleos embrionarios.

Este trabajo revela que las regiones de ADN satélite centroméricas y pericentroméricas contienen secuencias de unión al factor de transcripción Hth y que este se une de forma activa a las regiones de heterocromatina constitutiva *in vivo*. Homothorax estaría ayudando a la transcripción de secuencias satélite repetidas, que serán procesadas por la maquinaria del ARN interferente, y esta función estaría siendo desempeñada no solo durante las divisiones sincitiales del desarrollo temprano sino en etapas más tardías del embrión.

Este trabajo demuestra que en ausencia del gen *homothorax* la heterocromatina constitutiva no se forma correctamente. Las regiones de heterocromatina son incapaces de adquirir la estructura altamente compactada que las caracteriza. Por ello se concluye que el factor de transcripción Hth es fundamental en

el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

Finalmente, el trabajo aquí presentado pone de manifiesto una novedosa función de gran relevancia de los factores de transcripción y la implicación de dichas proteínas en el complejo proceso de formación de la heterocromatina.

2-INTRODUCCIÓN

2.1. La biología del desarrollo y *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

La biología del desarrollo es la disciplina encargada de estudiar el proceso de formación de los organismos a través de su desarrollo embrionario. Esta disciplina es también la encargada del estudio de todos los procesos implicados en posibilitar el desarrollo de los organismos vivos como son la diferenciación celular, el crecimiento y el recambio celular, la regeneración y la metamorfosis.

Los organismos multicelulares se originan mediante un proceso de cambios progresivos al cual denominamos desarrollo. El desarrollo de un organismo multicelular tiene comienzo a partir de una célula o gameto fecundado llamado cigoto, el cual se divide para dar origen a todas las células que compondrán el organismo adulto. El desarrollo embrionario del organismo acontece entre la fecundación y su nacimiento, pero los organismos vivos permanecerán en desarrollándose a lo largo de su vida.

Los objetivos fundamentales del proceso de desarrollo son la generación de diversidad celular y la organización de un patrón de orden sistémico. De esta forma, cada organismo vivo adquiere una morfología concreta determinada por un plan corporal o “bauplan”.

A lo largo del desarrollo de un organismo ocurren una serie de procesos fundamentales. La diferenciación celular permite generar una basta diversidad de tipos celulares distintos a grupos celulares inicialmente iguales. La morfogénesis permite la organización de dichas células diferenciadas en los diversos y complejos tejidos y órganos del individuo. La morfogénesis dará lugar a un patrón de orden general de los órganos que se mantendrá constante dentro de los diferentes individuos de una misma especie, y que les otorgará un plan corporal y morfología diferentes a los individuos de otras especies. Además, existe un proceso de crecimiento activo del organismo, el cual precisa de diversos mecanismos de control de tamaño. Durante el desarrollo del organismo es de extrema importancia que las células se dividan un número concreto de veces y que tanto las células como los órganos crezcan hasta alcanzar un tamaño determinado concreto. Otro proceso indispensable durante el desarrollo de un organismo es la formación de una línea germinal, es decir, la aparición de gametos que aseguren la reproducción del individuo y la transmisión de la información

necesaria para la correcta formación y desarrollo de un nuevo organismo viable y fértil en la siguiente generación.

Toda morfología final de un ser vivo depende estrechamente y es el resultado del proceso de desarrollo que la acabe generando. En relación a esto, debe tenerse además en cuenta que el ambiente puede jugar un papel importante en la formación de dicha morfología final. El desarrollo de los organismos vivos se encuentra influenciado por señales que provienen del ambiente que rodea al embrión o a la larva. Durante el proceso de desarrollo, el ambiente actúa de forma instructiva sobre un genoma reactivo. De este modo se forman los polifenismos, que son apariciones de fenotipos diferentes, cualitativamente distintos, partiendo de un genoma idéntico dependiendo de los factores ambientales en los que se desarrollen. Este fenómeno se conoce como plasticidad fenotípica (Pigliucci, 2006).

Estos fenómenos de desarrollo diferencial se encuentran estrechamente ligados y relacionados con la capacidad adaptativa propia de los sistemas complejos vivos. Pueden ser mediados por cambios abióticos en el medio (como las fluctuaciones del agua, la humedad, la luz, la temperatura) capaces de originar polifenismos estacionales, por cambios bióticos, como las fluctuaciones en la densidad de la población, o pueden ser polifenismos inducidos por la presencia de depredadores o la diferenciación en castas debida a diferencias nutricionales. Cabe destacar aquellos polifenismos morfológicos que son heredables y se transmiten a la descendencia sin más cambios en el genoma que señales epigenéticas. Por ejemplo, algunas mariposas heredan la capacidad para producir alas de distintos colores basada en la temperatura o en la cantidad de luz diaria experimentada por la oruga antes de pasar por su metamorfosis (Gilbert, 2003).

Estos cambios fenotípicos han de deberse a cambios en la regulación y expresión génica de la red encargada del control del proceso de desarrollo de una morfología concreta. Esto tiene evidentes implicaciones evolutivas, ya que podemos afirmar del mismo modo que para que se produzca un cambio a nivel macroevolutivo y la aparición de una entidad biológica nueva diferente al resto y con una morfología que la caracteriza, es imprescindible que se produzca un cambio en las redes de regulación de la expresión génica del proceso de desarrollo embrionario previamente existente. Cualquier morfología es dependiente de un proceso de morfogénesis, para dar lugar a un cambio evolutivo han de darse variaciones en los procesos de desarrollo. La evolución podría ser definida por complejos cambios morfofisiológicos.

Estos cambios en los *bauplanes* implican necesariamente cambios heredados en el desarrollo.

La biología del desarrollo se sirve de diferentes organismos modelos para su estudio. La experimentación realizada en este trabajo se ha centrado en el uso de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo. Debido a la facilidad con la que se puede trabajar con esta especie en el laboratorio y al amplio conocimiento alcanzado sobre su genética, *Drosophila melanogaster* resulta ser un excelente organismo modelo. Su empleo para el estudio de la genética se remonta a principios del siglo XX, cuando Thomas Hunt Morgan se valió de este organismo por primera vez (Morgan, 1910). Su ciclo vital es breve, pudiéndose estudiar varias generaciones en un corto periodo de tiempo, y su cultivo en el laboratorio es sencillo. Tiene únicamente 4 pares cromosómicos y su genoma fue secuenciado y publicado en el año 2000 (Adams, 2000). A día de hoy el tamaño de su genoma se estima en 139,73 Mb y contendría una cifra de 15.867 genes identificados (NCBI, 2013). Es conocido que al menos un 60% de los genes humanos implicados en el desarrollo de alguna enfermedad, presentan genes con homología en el genoma de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 2000) y aproximadamente el 50% de las secuencias proteicas de la mosca presentan homología en mamíferos (Reiter, 2001). Estos datos avalan el uso de *Drosophila melanogaster* como sistema modelo en biología del desarrollo.

Drosophila melanogaster, denominada comúnmente mosca de la fruta o del vinagre es una especie perteneciente al orden de los dípteros. Al ser un insecto holometábolo, realiza una metamorfosis completa para alcanzar su forma adulta o imago a partir de un estadio larvario. Ambas fases del desarrollo se encuentran separadas por un estadio de pupa.

El desarrollo de *D. melanogaster* depende de la temperatura. A 25°C, 22 horas tras la fecundación, el desarrollo embrionario termina y del huevo surge una larva. Durante aproximadamente los siguientes 5 días la larva aumenta considerablemente su tamaño y atraviesa 3 estadios larvarios diferentes, cada uno de los cuales se encuentra separado por un periodo de muda y correspondiente formación de la nueva cutícula externa. Habiendo transcurrido dicho periodo se inicia el proceso de pupación. En este momento la cutícula externa de la larva se endurece y oscurece formándose de esta forma el pupario. Dentro del pupario acontece la metamorfosis. A lo largo de los siguientes 4 días, los tejidos larvarios se descomponen mediante histólisis y surgen las estructuras adultas a partir de los histoblastos y tejidos imaginales presentes en la

larva. Los histoblastos son grupos de células encargados de originar el futuro tejido de la epidermis abdominal de la mosca adulta. Por su parte, los denominados discos imaginales representan los primordios de gran parte de órganos, apéndices y exoesqueleto cuticular del adulto, incluyendo las alas, patas, torax, cabeza, antenas, ojos y la genitalia. Los discos imaginales son unas estructuras en forma de saco y compuestas por células epiteliales dispuestos en el interior de las larvas cuyo origen es embrionario. Una vez finalizada la metamorfosis, emerge del pupario una mosca adulta. *Drosophila melanogaster* sobrevive correctamente en un rango de temperaturas situado entre los 17°C y los 29°C y es capaz de adecuar la duración de su ciclo vital en función de la temperatura ambiental. A 25°C su ciclo vital se completa en torno a los 10 días, mientras que a 17°C se prolonga hasta los 21 días. Una hembra adulta puede llegar a producir como máximo entre 300 y 400 huevos en 10 días y realizar puestas de hasta 75 huevos durante los primeros días.

El trabajo aquí presentado se centra en el estudio del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. Las primeras fases de este proceso tienen lugar en un citoplasma sincitial. Los núcleos individuales se disponen en un citoplasma común que ocupa la totalidad del interior del embrión y de esta forma se suceden las primeras divisiones nucleares sin que tenga lugar la celularización. Esta etapa del desarrollo embrionario temprano recibe el nombre de preblastodermo sincitial y durante la misma, las divisiones mitóticas de los núcleos sincitiales ocurren a gran velocidad. La condensación, segregación y descondensación cromosómica necesarias para completar las divisiones mitóticas se suceden rápidamente durante las primeras 10 divisiones de los núcleos sincitiales y cada ciclo mitótico se completa en menos de 10 minutos. Estos ciclos mitóticos sincitiales reducidos se caracterizan por la ausencia de fases G1 y G2. A su vez, la descondensación de la cromatina y ruptura de la membrana nuclear comienza en la telofase y no en la profase, lo cual sugiere un adelanto en el principio de la fase S (Foe, 1993). Cabe destacar que durante esta fase temprana del desarrollo embrionario no existe transcripción alguna de genes cigóticos. Por ello, las rápidas divisiones de los núcleos sincitiales y el desarrollo embrionario del preblastodermo sincitial está dirigido y organizado por proteínas y ARNs de origen materno. Este material es heredado de la madre y se encuentra disponible en el citoplasma común del sincitio.

Las divisiones sincitiales tienen lugar en el centro del interior embrionario y una vez finalizadas los núcleos migran a las regiones periféricas del embrión. Alcanzado el ciclo de división número 13 y con todos los núcleos dispuestos en la periferia del

embrión, se inicia la transcripción de los genes cigóticos. Esta etapa recibe el nombre de transición de blástula media. En este momento los ciclos de división comienzan a ralentizarse y en el ciclo mitótico número 14 queda establecido el blastodermo celular. Para que el blastodermo celular pueda formarse, la membrana plasmática del oocito ha de invaginarse entre los núcleos sincitiales compartimentalizándolos y originando así células individualizadas. En el blastodermo celular las células quedan dispuestas en una monocapa en la periferia rodeando el interior del embrión (Foe and Alberts, 1983).

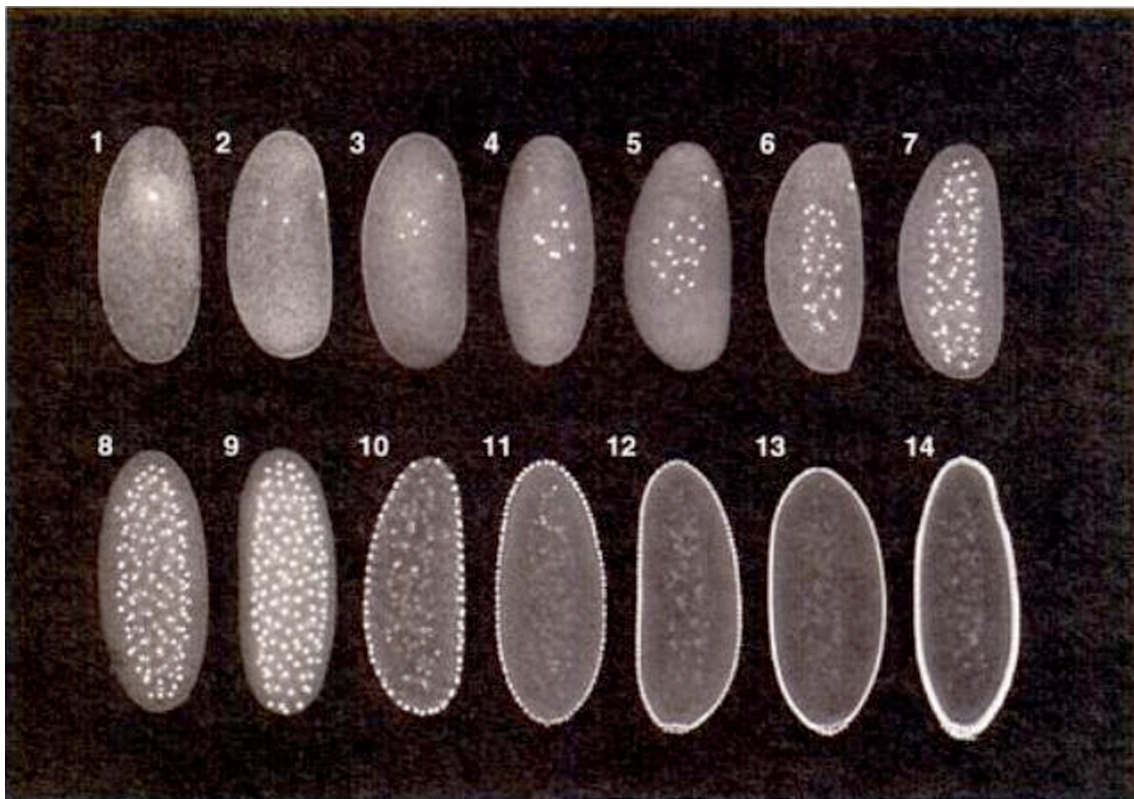


Figura I.1. Divisiones nucleares durante el desarrollo embrionario temprano de *Drosophila melanogaster*. (Gilbert, 2003).

En la siguiente etapa del desarrollo embrionario la blástula da paso a la gástrula. Durante la gastrulación se originan el ectodermo, el mesodermo y el endodermo, las tres capas embrionarias que darán lugar a los tejidos larvarios. En esta etapa, la banda germinal, conformada por el ectodermo y el mesodermo, se extiende en dirección posterodorsal y posteriormente se retrae en dirección ventral.

Durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* suceden una serie de importantes procesos morfogenéticos. La acción sucesiva de los genes maternos, expresados en las ovariolas de la madre y cuyos transcritos han sido depositados en el huevo, regulan la expresión de los genes cigóticos *gap*, cuyos productos génicos regularán a su vez la expresión de los genes *pair-rule*. Estas proteínas activan la expresión de los genes de polaridad segmental que dividirán finalmente el embrión en 14 segmentos (Lawrence, 1992). La identidad segmental y la especificación de las estructuras que desarrollará cada segmento viene determinada por la expresión y acción de los genes homeóticos o genes Hox. *Drosophila melanogaster* posee 8 genes Hox los cuales quedan agrupados en 2 complejos situados en el cromosoma 3. El primero de ellos, el complejo *Antennapedia* regula la formación y desarrollo de la cabeza y los 2 primeros segmentos torácicos. El segundo complejo, *Bithorax*, se encarga de atribuir la identidad segmental al tercer segmento torácico y a los segmentos abdominales (Lewis, 1978; Sánchez-Herrero, 1985).

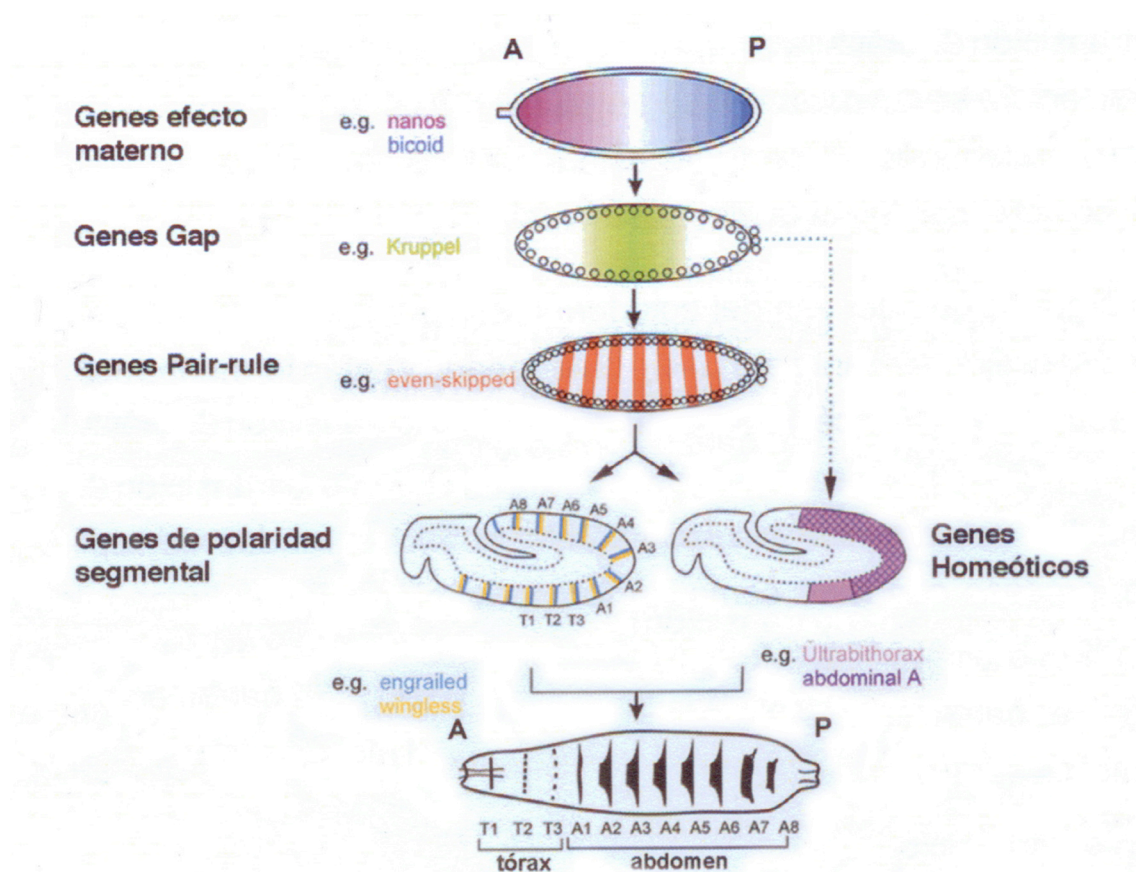


Figura I.2. Formación del eje antero-posterior durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*. (Sanson, 2001).

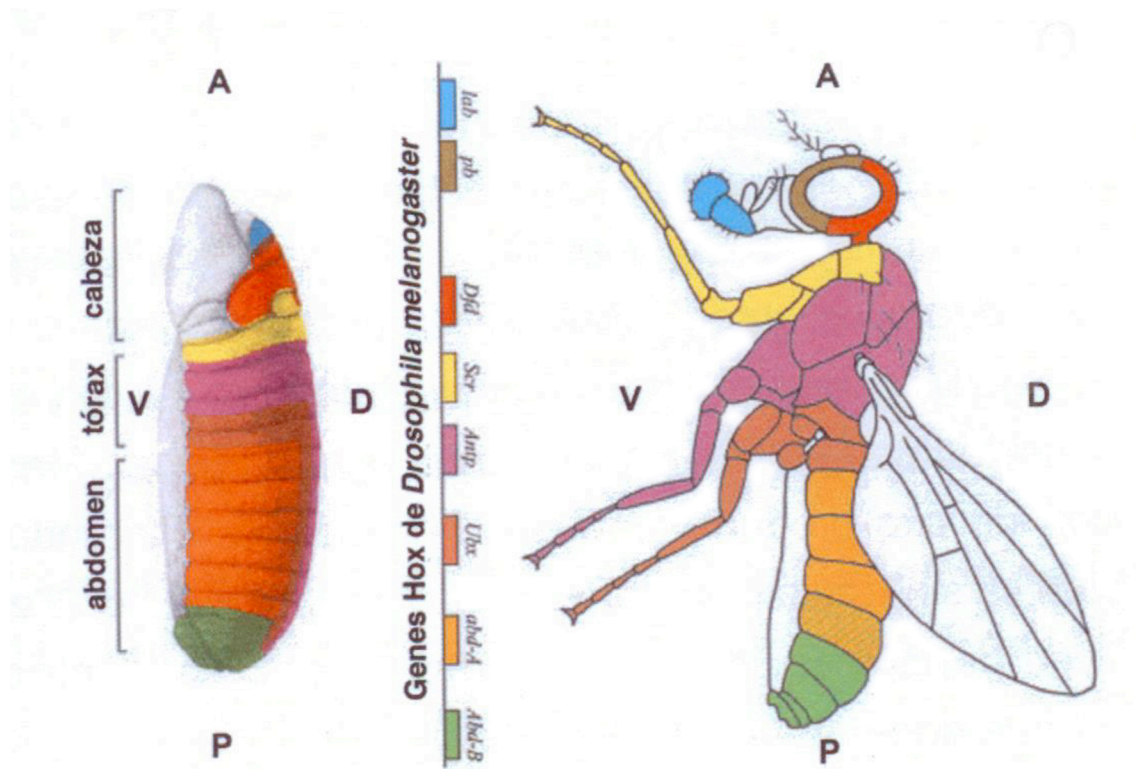


Figura I.3. Especificación de la identidad segmental mediada por genes HOX en *D. melanogaster*.

2.2. La cromatina nuclear, su composición y estructura

El material genético nuclear de los organismos eucariotas se encuentra empaquetado en una estructura denominada cromatina. En núcleos interfásicos la cromatina nuclear aparece como una maraña de fibras de material genético, la cual mediante un proceso de condensación y compactación progresiva, durante el proceso de división celular, acaba individualizándose en unidades discretas denominadas cromosomas. Cada cromosoma se encuentra constituido por una única molécula de ADN y una serie de proteínas accesorias.

Las bases sobre la composición y la estructura de la cromatina fueron sentadas durante las décadas de 1960 y 1970 (Brown, 1966; Kornberg, 1974; Finch 1977). La composición mayoritaria de la cromatina estaría comprendida por ADN y una serie de proteínas denominadas histonas. Otros componentes minoritarios incluirían proteínas accesorias no histónicas, ARN, lípidos, iones (Stein, 1975). Las histonas son proteínas básicas de bajo peso molecular, filogenéticamente muy conservadas y poseen fuerte

afinidad electrostática por los grupos fosfato del ADN. Existen cinco tipos fundamentales de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4.

La unidad estructural básica de la cromatina se denomina nucleosoma. Los nucleosomas constan de un núcleo o elemento central proteico compuesto por un octámero de histonas en torno al cual se acopla la molécula de ADN bicatenario. Cada octámero se encuentra constituido por dos histonas de los tipos H2A, H2B, H3 y H4. El ADN de doble cadena se acopla en torno a dichos octámeros proteicos describiendo algo más de dos vueltas de hélice (aproximadamente 200 pb) (Fernández-Piqueras, 2002). La sucesión de nucleosomas es conocida como fibra nucleosómica. Esta estructura presenta un diámetro aproximado de 10nm. Los nucleosomas de la fibra nucleosómica se encuentran separados por un fragmento de ADN espaciador al cual se asocia la histona H1.

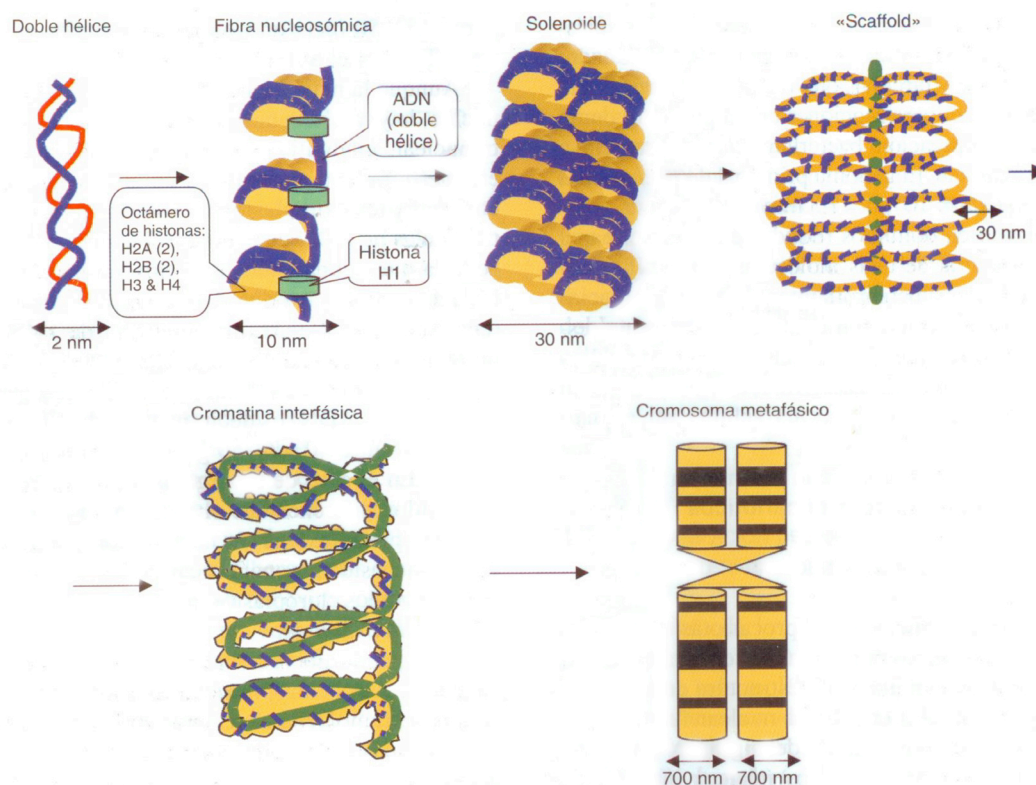


Figura I.4. Organización estructural de la cromatina. (Fernández-Piqueras, 2002).

La fibra nucleosómica se pliega en un orden superior de compactación originando la estructura de 30nm de diámetro denominada solenoide. Esta estructura

se mantiene estable gracias a la histona H1, presente en los puentes internucleosómicos, que ocupa la parte central o interior del solenoide. El empaquetamiento de la cromatina continúa, alcanzando su máximo grado en el cromosoma metafásico (700nm de diámetro). La fibra solenoide se pliega formando lazos de tamaño variable sobre un eje central de proteínas no histónicas denominado “*scaffold*”. Entre las proteínas presentes en este esqueleto proteico central destacan las topoisomerasas de tipo II, las cuales establecen una interacción con secuencias específicas de ADN. Finalmente, esta estructura adopta una configuración helicoidal superenrollada, más o menos compactada según se trate respectivamente de un cromosoma metafásico o una fibra de cromatina interfásica.

Según su grado de condensación durante la interfase celular, podemos clasificar la cromatina en dos tipos: eucromatina y heterocromatina. Ambos tipos de cromatina pueden ser diferenciados mediante tinción del ADN empleando agentes intercalantes, de esta forma, la cromatina débilmente teñida se corresponde con la eucromatina y las regiones densamente teñidas con regiones de heterocromatina. La mayor parte de la cromatina nuclear se encuentra caracterizada como eucromatina. La eucromatina posee una configuración estructural laxa y ligeramente compactada durante la interfase celular y presenta un ciclo de condensación a lo largo del ciclo celular, alcanzando su máximo grado durante la metafase. El grado de compactación de la cromatina se encuentra íntimamente relacionado con su accesibilidad y la posibilidad de expresión génica. Por ello, la eucromatina es rica en secuencias génicas transcripcionalmente activas y genes codificantes. Por el contrario, la heterocromatina posee una configuración estructural densamente compactada a lo largo de todo el ciclo celular y se encuentra mayoritariamente constituida por las regiones transcripcionalmente inactivas del genoma. Las regiones de heterocromatina son regiones pobres en contenido de genes codificantes para proteínas. Este tipo de cromatina es característico de las regiones teloméricas, centroméricas y pericentroméricas, es rico en secuencias de ADN repetido y es el último ADN en replicarse durante el periodo S del ciclo celular. Al contrario que la eucromatina, las regiones de heterocromatina no se ven sometidas al proceso de recombinación meiótica. El alto grado de compactación de la heterocromatina impide el acceso de la maquinaria de transcripción génica al ADN, por ello los genes presentes en la heterocromatina aparecen inactivos o silenciados. Además, puede ejercer un efecto regulador negativo sobre los genes situados en su proximidad desencadenando el proceso conocido como silenciamiento de la expresión génica mediante posición.

Pese a ser inactiva desde el punto de vista de la transcripción génica de secuencias codificadoras de proteínas, la heterocromatina posee y desarrolla funciones esenciales y de vital importancia para la célula. La heterocromatina tiene una importante función estructural y se encarga de dar cohesión al núcleo celular, así como de ayudar a establecer la organización de los dominios nucleares que favorecerán y permitirán que la eucromatina se replique y transcriba con una eficiencia máxima. La presencia de heterocromatina es también de vital importancia para posibilitar la correcta división celular. Sin la presencia de heterocromatina se imposibilita la correcta formación de los cromosomas y la función de los centrómeros. La cohesión de las cromátidas se ve comprometida así como su correcta separación durante la mitosis celular. Una incorrecta formación de la heterocromatina también facilita, al ser regiones ricas en el contenido de secuencias repetidas, la aparición de fenómenos de recombinación cromosómica, provocando rupturas en los cromosomas y pérdidas del material genético de los núcleos celulares.

La heterocromatina tiene además un papel importante en el control y modulación de la regulación de la expresión génica. Se puede formar en regiones del genoma que previamente se encontraban en conformación de eucromatina. De este modo, al tener lugar el proceso de heterocromatinización de promotores génicos y secuencias codificadoras previamente abiertas a la transcripción activa, se produce un nuevo tipo de silenciamiento génico. Estas regiones permanecen en una conformación estructural densamente compactada y su transcripción es impedida.

Cabe destacar finalmente que la heterocromatina puede, a su vez, ser clasificada dentro de dos tipos adicionales: la heterocromatina constitutiva y la heterocromatina facultativa. La heterocromatina constitutiva es estable y conserva sus propiedades heterocromáticas durante todas las etapas del desarrollo y en todos los tejidos del organismo. Esta heterocromatina es la misma en todas las células y está compuesta en su mayoría por las regiones teloméricas, centroméricas y pericentroméricas del genoma (Grewal, 2002). El componente principal de la heterocromatina constitutiva es el ADN satélite, estando este formado por secuencias de ADN cortas y repetidas en tándem. Por su parte, la heterocromatina facultativa varía dentro de las células de un mismo organismo y depende del tejido y del momento del desarrollo en el cual se encuentre dicha célula. La heterocromatina facultativa permite la regulación de la expresión génica mediante el silenciamiento por formación de heterocromatina. La heterocromatina facultativa se suele formar en regiones ricas en secuencias génicas codificantes y puede ser revertida.

2.3. La epigenética y el proceso de formación de heterocromatina en *Drosophila melanogaster*

La epigenética es la disciplina encargada de estudiar la variación de la expresión génica que no es debida a ninguna modificación en la secuencia de bases de ADN de los genes, y que puede además heredarse durante las divisiones celulares e incluso de una generación a la siguiente (Grewal, 2002). La regulación epigenética se sirve de los procesos de metilación del ADN y de los procesos de metilación/desmetilación, acetilación/desacetilación y fosforilación/desfosforilación de las histonas para inducir cambios conformacionales en la cromatina nuclear que finalmente facilitan o impiden la expresión génica. Las colas o extremos amino-terminales de las histonas presentan un alto grado de conservación entre especies distantes y están sujetas a diversas modificaciones epigenéticas covalentes postraduccionales (Strahl, 2000; Jenuwein, 2001).

Desde el punto de vista de su composición molecular, el ADN de las regiones de heterocromatina se caracteriza por encontrarse altamente metilado en casi todas las especies. Sin embargo, *Drosophila melanogaster* supone una excepción a este mecanismo molecular ya que su genoma no posee niveles significativos de metilación (Fernández-Piqueras, 2002). Además, y siendo este el factor molecular relevante en *Drosophila melanogaster*, las histonas presentes en el ADN de las regiones de heterocromatina poseen una serie de modificaciones epigenéticas específicas que no aparecen en las histonas presentes en las regiones de eucromatina. Las principales características moleculares de las histonas de las regiones heterocromáticas son su estado hipoacetilado y la abundancia de metilaciones. De especial importancia es la metilación del residuo 9 de lisina de la histona 3 (H3K9), claro marcador que caracteriza las regiones compactas de heterocromatina (Ebert, 2006). Esto no quiere decir que por necesidad una histona dispuesta en una región de heterocromatina no pueda presentar algún tipo de acetilación y que una histona de una región de eucromatina vaya a estar completamente desprovista de metilaciones. El proceso de formación de heterocromatina en *Drosophila melanogaster* es complejo y durante el mismo se suceden una serie de modificaciones epigenéticas en las histonas que posibilitan la correcta formación de la heterocromatina. Este trabajo se centra en el estudio de la formación de la heterocromatina constitutiva y a continuación se exponen los principales eventos que tienen lugar durante dicho proceso.

Según fue determinado mediante experimentos de epistasia (Swaminathan, 2005), antes de que sea posible cualquier modificación epigenética de las histonas, ha de producirse un fenómeno de diferente carácter en la cromatina. Se trata del reemplazo de la histona H2A por una histona variante de la misma denominada como H2Av. Esta histona H2Av aparece acumulada en las regiones de heterocromatina centromérica (Leach, 2000) y pertenece a la familia H2A.Z de variantes de la histona H2A (Jiang, 1998). La histona H2A.Z se encuentra también enriquecida en la heterocromatina pericentromérica durante el desarrollo temprano de mamíferos (Rangasamy, 2003). Las proteínas H2A.Z se encuentran altamente conservadas y H2Av es una proteína esencial en *Drosophila melanogaster* (van Daal, 1988; van Daal, 1992). El reemplazamiento de histonas canónicas por sus variantes se lleva a cabo por complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (Krogan, 2003; Mizuguchi, 2004) y presenta un mecanismo para el control de la transcripción mediante la alteración estructural de los nucleosomas.

Como ya ha sido mencionado, la modificación epigenética característica de la heterocromatina en *D. melanogaster* es la metilación del H3K9, pero para que dicha metilación pueda llevarse a cabo ha de producirse la desacetilación previa de dicho residuo de lisina mediada por la proteína Rpd3 (Rudolph, 2007). Una vez que la histona H3 ha sido desacetilada en el residuo K9, éste puede ser metilado por la metiltransferasa Su(var)3-9 (Rea, 2000; Nakayama, 2001; Schotta, 2002). El residuo H3K9 puede llegar a sufrir hasta tres metilaciones, de esta forma, las regiones de heterocromatina de los cromosomas de *Drosophila melanogaster* quedan enriquecidas en residuos H3K9 dimetilados y trimetilados (Fischle, 2003).

A la metilación del H3K9 le siguen una serie de procesos encargados de completar el establecimiento de la heterocromatina. Al metilarse el H3K9 se crea un sitio de unión para una proteína no histona denominada *Heterochromatin Associated Protein 1* (HP1), la cual es reclutada a dichos residuos (Bannister, 2001; Lachner, 2001; Nakayama, 2001). La proteína HP1 es también conocida en *Drosophila melanogaster* como Su(var)2-5 (Eissenberg, 1990; Eissenberg, 1992; Eissenberg, 2000) y se encuentra involucrada en el proceso de silenciamiento génico y asociada a regiones de heterocromatina constitutiva, como las regiones centroméricas y teloméricas (James 1986; James 1989). La proteína HP1 facilita a su vez el reclutamiento de la HMT Su(var)4-20. Esta metiltransferasa se encargará finalmente de llevar a cabo la trimetilación del residuo 20 de lisina de la histona H4 (H4K20) (Kourmouli, 2004; Schotta, 2004).

Los experimentos de epistasia llevados a cabo por Swaminathan *et al.* (Swaminathan, 2005) añadieron un requisito previo a la metilación del H3K9 en *Drosophila melanogaster* a los eventos canónicos del proceso de formación de la heterocromatina previamente descritos (Grewal, 2003). Se trata de la acetilación del residuo 12 de lisina de la histona H4 (H4K12). La identidad de la enzima encargada de esta acetilación es desconocida (Swaminathan, 2005), pero la acetilación del residuo H4K12 se ha encontrado en la heterocromatina centromérica y pericentromérica tanto en *Drosophila melanogaster* como en plantas (Turner, 1992; Wako, 2003). Se ha sugerido que este evento podría ayudar al reclutamiento de una proteína HDAC encargada de desacetilar el H3K9 de forma previa a su metilación por la Su(var)3-9 (Swaminathan, 2005).

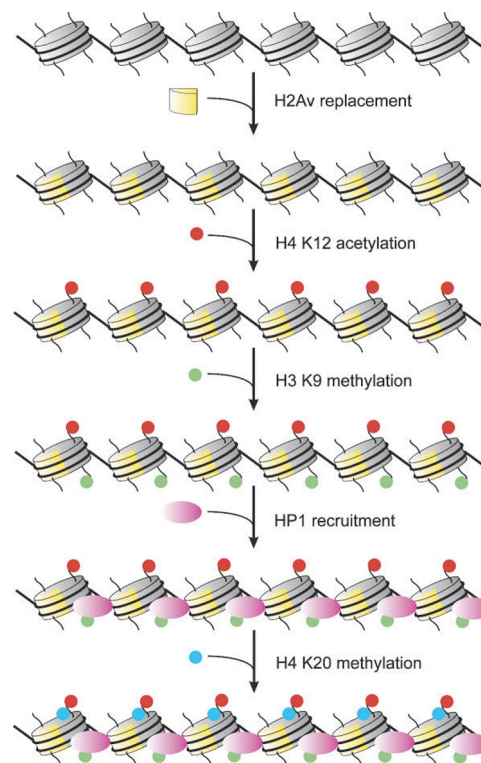


Figura I.5. Ruta de modificación de histonas durante el proceso de formación de la heterocromatina en *Drosophila melanogaster*. (Swaminathan, 2005).

Agrupando los datos hasta ahora aportados, es posible establecer una ruta del proceso de modificación de histonas, que tiene lugar durante formación de la heterocromatina, en la que situar la acción de las principales proteínas HMTs y

HDACs. En primer lugar se produciría el reemplazo de la histona H2A por la histona H2Av, modificándose así la estructura del nucleosoma. A continuación tendría lugar la acetilación del H4K12, a lo que le seguiría la desacetilación del H3K9 y tres metilaciones sucesivas de dicho residuo llevadas a cabo por la HMT Su(var)3-9. La trimetilación del H3K9 originaría un lugar de unión para la proteína HP1 o Su(var)2-5 y finalmente se produciría la trimetilación del H4K20 por parte de la HMT Su(var)4-20.

Si bien esta es la ruta básica de modificación epigenética de histonas descrita, se ha de tener en cuenta que el fenómeno de la metilación del H3K9 ha resultado ser en sí mismo un proceso de gran complejidad. No solo es necesaria la desacetilación de dicho residuo, de forma previa al proceso de metilación y para que este pueda ocurrir correctamente en los embriones de *D. melanogaster* ha de tener lugar la desmetilación del residuo 4 de lisina de la histona H3 (H3K4). La metilación del H3K4 es una marca epigenética característica de las regiones transcripcionalmente activas de eucromatina. Para que la metilación del H3K9 pueda tener lugar correctamente la proteína Su(var)3-3 ha debido catalizar la desmetilación de la histona H3 en el residuo K4 (Rudolph, 2007). La metilación del H3K4 puede ser observada por vez primera en la etapa de blastodermo sictial, en el ciclo de división 12 del desarrollo temprano. Al formarse el blastodermo celular, en el ciclo 14, la metilación del H3K4 queda restringida al compartimento eucromático del núcleo y es en este momento observable por vez primera los estados metilados del H3K9 en el dominio nuclear de heterocromatina (Rudolph, 2007).

El proceso de heterocromatización ocurre también en regiones facultativas y sirve como control de la transcripción en regiones específicas del genoma. Este tipo de silenciamiento génico se lleva a cabo por las proteínas represoras del grupo Polycomb (PcG) y permite la expresión diferencial de diversos genes durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* siendo de vital relevancia para el mantenimiento de la represión transcripcional de genes homeóticos (Shao, 1999). Las proteínas PcG, al igual que la proteína HP1, son capaces de unir histonas mediante un cromodominio (Paro, 1991), y además de poder reclutar proteínas HDACs (Tie, 2001), el silenciamiento mediado por los complejos PcG genera modificaciones epigenéticas de las histonas. Las regiones silenciadas mediante la formación de heterocromatina facultativa presenta modificaciones epigenéticas características como la metilación del residuo 27 de lisina de la histona H3 (H3K27) (Ebert, 2006). Por su parte y en contraposición a las proteínas PcG, las proteínas del grupo Trithorax (TrxG) son las encargadas de salvaguardar durante el desarrollo embrionario la activación

transcripcional de los genes requeridos manteniendo estables las modificaciones epigenéticas características de las regiones de eucromatina, como es el caso de la metilación del residuo 4 de lisina de la histona H3 (H3K4) (Soshnikova, 2011).

Uno de los principales problemas a los que se ha enfrentado la epigenética es que las proteínas encargadas de llevar a cabo las distintas modificaciones epigenéticas de las histonas son incapaces de reconocer secuencias específicas de ADN (Huang, 2013). Por ello, uno de los principales retos actuales de los estudios epigenéticos es tratar de desvelar el mecanismo molecular encargado de guiar a los múltiples factores epigenéticos de modificación de histonas a las distintas regiones diana específicas del genoma. En la actualidad, parece que este enigma epigenético comienza a resolverse. Detrás de dicho mecanismo se encontraría la maquinaria del ARN interferente. Ha sido demostrado inicialmente en levadura que mediante la acción de ARN polimerasas y ARN polimerasas dependientes de ARN se generan transcritos de ARN de doble cadena (dsRNAs) que son procesados por la maquinaria del ARNi originando ARN de interferencia pequeños (siRNAs). Los siRNAs serían incorporados a un complejo de silenciamiento transcripcional inducido por ARN (RITS) encargado de llevar a cabo el silenciamiento mediante formación de heterocromatina en las regiones diana (Wassenegger, 2005; Westhof, 2005; Sontheimer, 2005).

Existen suficientes evidencias para afirmar que la presencia de secuencias de ADN repetido y la formación de ARNs cortos no codificantes son factores determinantes para la formación de la heterocromatina. Según ha sido descrito, los transposones y las secuencias de ADN repetido reclutan la maquinaria de formación de heterocromatina y son capaces de silenciar genes adyacentes (Selker, 1999; Hsieh, 2000). En levaduras ha sido descrito que la maquinaria del ARNi procesa los transcritos pericentroméricos originando ARNs de interferencia pequeños (siRNAs), los cuales serían necesarios para el correcto ensamblaje de la heterocromatina pericentromérica. La ARN polimerasa II participaría en este proceso vinculando la transcripción de las regiones pericentroméricas con la maquinaria del ARNi encargada de procesar los siRNAs y el ensamblaje de la heterocromatina (Kato, 2005). Ha sido también descrito en levadura que este proceso de formación de heterocromatina guiado por la maquinaria del ARNi es esencial para la formación de la heterocromatina centromérica. Este proceso sería responsable de la formación de la heterocromatina que flanquea el dominio cental de los cinetocoros en los centrómeros, permitiendo de esta forma el correcto acoplamiento de CENP-A y los cinetocoros (Folco, 2008).

Los estudios en la levadura *S. Pombe* han revelado el proceso mediante el cual opera el complejo de silenciamiento transcripcional inducido por ARN (RITS). Los transcritos de las secuencias centroméricas de ADN repetido son el molde de una ARN polimerasa dependiente de ARN (Rdp1) para generar un bucle de retroalimentación positiva de transcritos de ARN de doble cadena (dsRNAs) que serán procesados por las proteínas Dicer-1 y Argonauta de la maquinaria del ARNi originando ARNs de interferencia cortos (siRNAs). El complejo proteico RITS guiará a los factores epigenéticos para la formación de la heterocromatina y la metilación del H3K9 (Moazed, 2001; Kato, 2005; Volpe, 2003; Grewal, 2003; Sugiyama, 2005; Motamedi, 2004; Verdel, 2004; Ekwall, 2004; Grewal, 2007). Existe una vía de enlace demostrada entre los procesos de modificación de histonas como la metilación del H3K9 y el complejo RITS de la maquinaria del ARNi. Se trata de la intervención de la proteína accesoria Stc1, encargada de conectar la maquinaria epigenética de modificación de histonas con la señal de identificación de regiones diana presentada por el complejo RITS (Bayne, 2010).

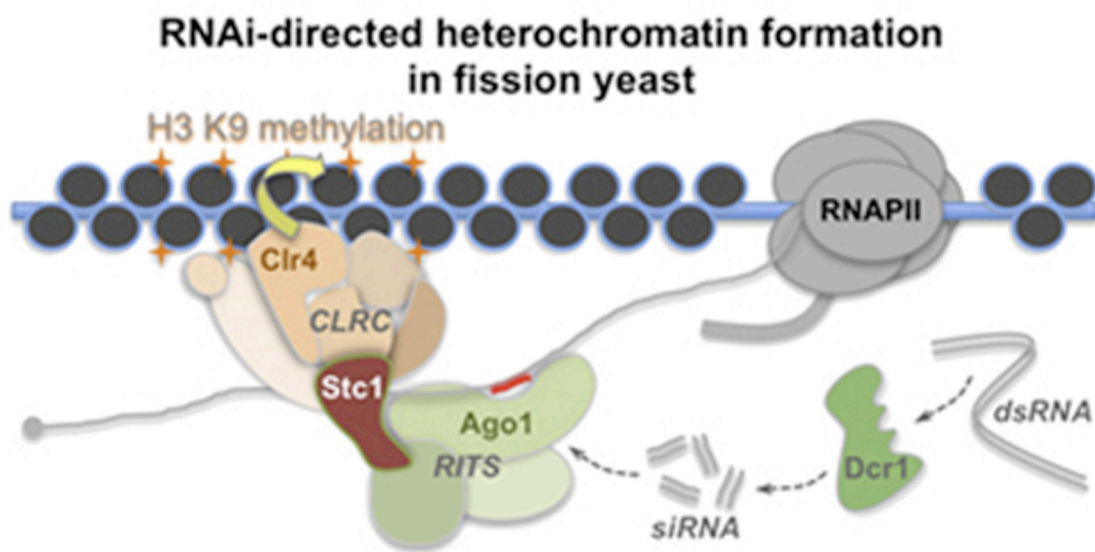


Figura I.6. Proceso de formación de la heterocromatina mediado por la maquinaria del ARNi en *S. pombe*. (Bayne, 2010).

En *D. melanogaster* se ha descrito igualmente una función de la maquinaria del ARNi en el proceso de formación de la heterocromatina. En concreto, ha sido demostrado que la proteína Argonauta-2 (*ago-2*) es necesaria durante el desarrollo

temprano del embrión de *D. melanogaster* para el correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica (Deshpande, 2005). Otra función de la maquinaria del ARNi en el proceso de formación de la heterocromatina en *D. melanogaster* se ha descrito en el silenciamiento de los elementos transponibles genómicos (Fagegaltier, 2009).

En *D. melanogaster*, ha sido demostrado que la transcripción de las regiones centroméricas y pericentroméricas correspondientes a las repeticiones de ADN satélite de la familia 1.688 de 359 pb, 260 pb y 361 pb se encuentran bajo el control y procesamiento de la maquinaria del ARN interferente, generándose a partir de dichas secuencias ARNs de interferencia cortos (siRNAs) (Usakin, 2007). La repetición de 359 pb de ADN satélite se localiza en la heterocromatina centromérica del cromosoma X. Las repeticiones de 260 pb y 361 pb de ADN satélite forman parte de las regiones de heterocromatina pericentromérica de los brazos cromosomales 2L y 3L respectivamente.

Recientemente ha sido descrito un nuevo mecanismo general de gran relevancia para la programación epigenética del genoma en *D. melanogaster* llevado a cabo por la interacción de la proteína Piwi y los ARNs de interferencia cortos asociados a dicha proteína (piRNAs) (Huang, 2013). El funcionamiento de este mecanismo sería similar al proceso de silenciamiento por formación de heterocromatina llevado a cabo por el complejo RIST y los siRNAs. Ha sido descrito que los complejos de Piwi-piRNAs se asociarían a las secuencias complementarias de los piRNAs a lo largo del genoma regulando su estado epigenético (Yin, 2007; Lin, 2008). A su vez ha sido demostrado que la proteína Piwi es una proteína asociada a la cromatina y es capaz de interaccionar directamente con la proteína HP1 (Brower-Toland, 2007). En un inicio se pensó que el mecanismo de silenciamiento mediado por Piwi-piRNAs participaba únicamente en el silenciamiento de transposones en la línea germinal, pero en la actualidad se ha demostrado que este mecanismo de silenciamiento por remodelación estructural de la cromatina tiene un papel relevante en todo el genoma y en las células somáticas (Peng, 2013). Se ha comprobado que los complejos Piwi-piRNAs se unen a numerosas secuencias complementarias a lo largo de todo el genoma en las células somáticas, implicando a los piRNAs en un mecanismo general de gran importancia que guía a la proteína Piwi y a los factores epigenéticos asociados a Piwi y que programa de esta manera el estado epigenético del genoma (Huang, 2013). Se ha demostrado que los piRNAs son capaces de reclutar hacia sus secuencias complementarias la proteína Piwi, la proteína HP1 y la

proteína Su(var)3-9 incrementándose los niveles de metilación de los H3K9 de dichas regiones y reduciendo en las mismas la capacidad asociación con la ARN polimerasa II. La ausencia de Piwi modifica drásticamente el mapa epigenético del genoma, incluido el perfil genómico de metilaciones de los H3K9 y el perfil de transcripción mediada por ARN polimerasa II (Huang, 2013).

Es posible especular que este mecanismo de silenciamiento mediante formación de heterocromatina inducido por ARNs no codificante sea relevante no solo para la formación de la heterocromatina de las regiones centroméricas y pericentroméricas y el silenciamiento de los elementos transponibles, sino para la correcta formación general de las diferentes regiones de heterocromatina presentes en el genoma.

2.4. El gen *homothorax*: un gen complejo

Este trabajo se centra en el papel desempeñado por el gen *homothorax* en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

El gen *homothorax* (*hth*) codifica para un factor de transcripción (Hth) miembro de la familia de proteínas con homeodominio atípico TALE (*Three Amino Acid Loop Extensión*) (Bürglin, 1997). Está filogenéticamente conservado, presentado genes ortólogos en vertebrados superiores, que son los genes parálogos *meis* y *prep* (Moens, 2006). Hth contiene dos dominios proteicos altamente conservados. El dominio Homothorax-Meis (HM) en el tercio N-terminal de la proteína mediante el cual Hth es capaz de unir al factor de transcripción Exd, y un homeodominio (HD). El homeodominio de Hth, al tratarse de una proteína TALE, presenta 3 residuos extra situados entre las hélices 1 y 2, condición generada por un *splicing* alternativo del homeobox de *homothorax* (Gehring, 1992; Gehring, 1993; Mukherjee, 2007).

El *locus* del gen *homothorax* posee una gran complejidad. Se extiende ocupando una región del genoma superior a las 100 Kb en el brazo derecho del cromosoma 3. El pre-ARNm de *hth* se compone de 14 exones cortos separados por intrones de gran tamaño. Los exones del 2 al 6 codifican para el dominio HM, mientras que el homeodominio (HD) se encuentra codificado por los exones del 11 al 13.

El pre-ARNm de *hth* está sujeto a *splicing* alternativo originando 6 ARNm maduros (Flybase, 2013). Los diferentes ARNm de *hth* se traducen dando lugar a distintas isoformas proteicas. Tres de ellas contienen tanto el dominio HM como el dominio HD, mientras que las tres isoformas restantes son cortas y contienen un único dominio. Dos de las isoformas cortas contienen únicamente el dominio HM y la restante presenta exclusivamente el homeodominio HD (Flybase, 2013).

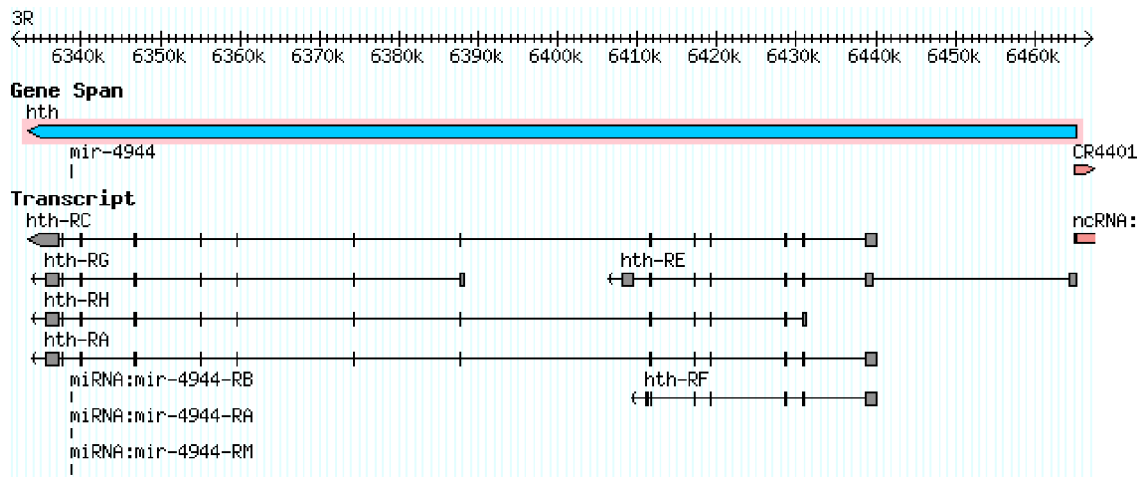


Figura I.7. Locus del gen *homothorax*. (Flybase, 2013).

La compleja estructura genética de *hth*, el procesamiento de su transcrito mediante *splicing* alternativo, así como el gran tamaño de sus intrones, que además hace pensar en la existencia de elementos reguladores en sus secuencias no codificantes, se encuentran conservados entre los genes ortólogos de *hth* en diversas especies (Irimia, 2011).

Se han descrito una gran diversidad de funciones del gen *homothorax* durante el desarrollo embrionario, estando muchas de ellas conservadas entre los genes ortólogos de *hth* en distintas especies. Las funciones descritas otorgan al gen *homothorax* un papel en el desarrollo del torax (Aldaz, 2005), en el desarrollo de las extremidades y las alas y la formación del eje proximo-distal (Abu-Shaar, 1998; Gonzalez-Crspo, 1998; Mercader, 1999; Wu, 1999; Azpiaz, 2000; Casares, 2000; Azpiaz, 2002), en el desarrollo de antenas (Casares, 1998; Dong, 2002), en el desarrollo de ojos (Pai, 1998; Bessa, 2002; Lappin, 2006; Heine, 2008; Wernet, 2003;

Brockmann, 2011; Zhang, 2011; Singh, 2011; Pichaud, 2000) y en la proliferación celular (Peng, 2009; Lopes, 2010).

Pero su función mejor conocida es junto con el factor de transcripción Exd (*extradenticle*), como cofactor de genes HOX durante el desarrollo embrionario confiriendo identidad segmental (Azpiazu, 1998; Peifer, 1990; Ryoo 1999a; Ryoo, 1999b; Moens, 2006). Según ha sido descrito, Hth se uniría a Exd en el citoplasma traslocándolo al núcleo (Rieckhof, 1997; Pai, 1998; Kurant, 1998; Abu-Sharr, 1999). Una vez en el núcleo, Hth y Exd se unirían a una proteína homeótica codificada por un gen HOX formando un complejo trimérico. Este complejo trimérico se uniría a la secuencia diana del gen HOX con una alta especificidad debido a la presencia de los tres factores de transcripción.

La mutación del gen *homothorax* es, en homocigosis, letal para el embrión. La presencia del componente materno es esencial para el correcto desarrollo embrionario y en ausencia del mismo los embriones ven arrestado su desarrollo de forma previa al ciclo de división 10 de los núcleos sincitiales (Salvany, 2009). Tan solo entre un 8-9% de los embriones desarrollados en ausencia del componente materno de *hth* llegan a secretar cutícula, y los que lo consiguen presentan fusión y transformación de segmentos y pérdidas de estructuras (Salvany, 2009). Este fenotipo es similar al que presentan los embriones desarrollados en ausencia del componente materno de *exd* (Rauskolb, 1993). Esto sugiere que ambos genes se complementan en su función durante las divisiones sincitiales del desarrollo temprano, de forma previa a la celularización embrionaria y a la transcripción de los genes cigóticos (Salvany, 2009). Debido a ello, y a pesar de los fenotipos severos mostrados por los embriones desarrollados en ausencia del componente materno de *hth*, ha sido propuesto que el pequeño porcentaje de embriones capaces de proseguir la embriogénesis es debida a un rescate parcial de la función por parte del componente materno de *exd* (Salvany, 2009).

Los embriones desarrollados en ausencia del componente materno de *hth* muestran ya en el ciclo 5 de división de los núcleos sincitiales fragmentación del ADN. Estos fragmentos de ADN aparecen dispersos en el citosol sincitial y los núcleos en división muestran figuras mitóticas aberrantes (Salvany, 2009). La proteína identificadora del centrómero (CID) aparece difusa y en algunos núcleos es imposible detectar la presencia de los centrómeros. Además, puede observarse en algunos núcleos una gran pérdida de material cromosómico (Salvany, 2009). Debido al fenotipo

de estos embriones se propuso una nueva función para el gen *homothorax*. Dicho gen estaría ayudando al correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica durante las divisiones preblastodérmicas del desarrollo embrionario temprano (Salvany, 2009). Esta función del factor de transcripción Hth novedosa e involucra directamente la participación activa de un factor de transcripción en el proceso de formación de heterocromatina.

En un contexto sincitial, Hth estaría, posiblemente junto con el factor de transcripción Exd, actuando con la ARN polimerasa II facilitando la transcripción de secuencias de ADN satélite repetido de origen centromérico. Los transcritos de estas secuencias, que se encuentran disminuidos en embriones mutantes para *hth*, serían necesarios para el correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica (Salvany, 2009).

Los defectos en la formación de la heterocromatina pueden desencadenar inestabilidad genómica. Según ha sido descrito, el gen ortólogo de *hth* en vertebrados *prep1* posee una función salvaguardando la estabilidad genómica (Iotti, 2011). Es posible relacionar dicha función de *prep1* con su implicación en diversos tipos de procesos cancerosos. Por ello, el estudio y la comprensión de la función desempeñada por el gen *hth* en el proceso de formación de heterocromatina es de crucial interés. Además, cabe destacar que el gen *meis1*, también ortólogo de *hth*, se encuentra mutado en distintos tipos de leucemias, neuroblastoma y cáncer de ovarios (Moskow, 1995; Thorsteinsdottir, 2001; Yeoh, 2002; Geerts, 2003; Gilbert, 2003; Rosales-Avina, 2011).

3-OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es ampliar el estudio de la función desempeñada por el gen *homothorax* en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

Determinar nuevas evidencias que indiquen una formación incorrecta de la heterocromatina constitutiva en embriones desarrollados en ausencia de Hth. Precisar si la función de *homothorax* trasciende la acción de ensamblaje de la heterocromatina centromérica y se extiende a la formación de otras regiones de la heterocromatina constitutiva. Establecer si el papel de Hth en la formación de heterocromatina se limita a las divisiones nucleares sincitiales del desarrollo temprano o si sigue desempeñando dicha función en fases más avanzadas del blastodermo celular. Analizar en ausencia de Hth el estado de la ruta de modificación de histonas. Y profundizar en la implicación y función molecular del factor de transcripción Hth en el proceso de formación de la heterocromatina.

Un interés añadido a este trabajo es arrojar nueva luz sobre la participación de los factores de transcripción en el proceso de formación de la heterocromatina, lo cual describiría una novedosa función relevante y de vital importancia de estas proteínas.

Para ello el trabajo se ha centrado en tres áreas de estudio principales:

1. Estudio del fenotipo de incorrecta formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* en ausencia del factor de transcripción Homothorax.
2. Caracterización del estado de la ruta de modificación de histonas en embriones de *Drosophila melanogaster* desarrollados en ausencia del factor de transcripción Homothorax.
3. Análisis de la función molecular del factor de transcripción Homothorax en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*.

4-RESULTADOS

4.1. Estudio del fenotipo de incorrecta formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* en ausencia del factor de transcripción Homothorax

El primer objetivo de este trabajo consiste en ampliar los estudios sobre los fenotipos de embriones desarrollados en ausencia de Hth que denotan la incorrecta formación de la heterocromatina constitutiva y ponen de manifiesto la función del factor de transcripción Hth en el proceso de formación de heterocromatina como un gen de vital importancia para la consecución de dicho proceso.

Para abordar este objetivo se ha analizado la posible existencia de roturas del ADN debido a la incorrecta formación de las regiones de heterocromatina, la descondensación de regiones típicas de heterocromatina como la región del ADN ribosómico y la incorrecta formación y compactación general de la heterocromatina constitutiva.

4.1.1. Análisis del incremento del daño, las roturas y la fragmentación del ADN nuclear de los embriones en ausencia de Homothorax

La fragmentación del ADN y la formación de figuras mitóticas aberrantes es un fenotipo común en embriones que tienen alterado algún componente que participa en el proceso de formación de la heterocromatina. Estos fenotipos son explicables por la incorrecta segregación cromosómica durante la mitosis, debida en muchos casos a fallos en el ensamblaje de los centrómeros. La formación de los centrómeros depende estrechamente y se ve alterada por los defectos en la formación de la heterocromatina centromérica y pericentromérica.

Citológicamente, los centrómeros se definen como una constricción primaria en los cromosomas metafásicos y son esenciales para el correcto reparto cromosómico (Dobie, 1999). Los centrómeros se encuentran embebidos en heterocromatina centromérica rica en ADN satélite repetido y son identificables por la presencia de una variante de la histona H3 conocida en *D. melanogaster* como CID (Blower, 2001). Ha sido descrito que en embriones tempranos preblastodérmicos en ausencia del componente materno del gen *hth*, la localización de la proteína CID está alterada, aparece difusa y a veces ausente (Salvany, 2009).

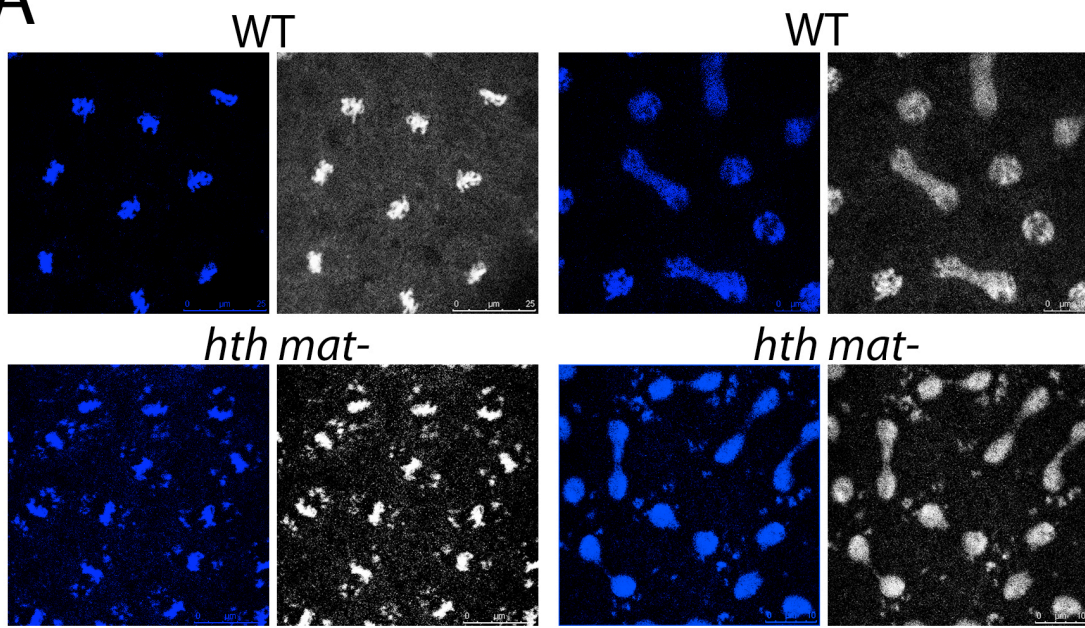
Los embriones desarrollados en ausencia de Hth comparten los fenotipos de fragmentación del ADN, defectos mitóticos y desigual reparto cromosómico con mutantes para genes esenciales en el proceso de formación de la heterocromatina como el gen *ago-2* (Deshpande, 2005). Los embriones desarrollados en ausencia de Hth poseen fragmentos de ADN teñidos con TOPRO3, que no participan en las divisiones nucleares, dispersos en el citosol del sincitio embrionario rodeando las figuras mitóticas de los núcleos en división (Fig. R.1.1A). Además de la fragmentación del ADN y la disfunción en la formación de centrómeros previamente descrita, un problema en el ensamblaje de las regiones de heterocromatina conlleva su descondensación. Dado que estas regiones están formadas por ADN altamente repetido en tándem, dicha descondensación puede desembocar en procesos de recombinación homóloga que generen roturas y daño en la cadenas de ADN nuclear.

Las proteínas variantes de la histona H2A de la familia H2A.X desempeñan un papel en la reparación de roturas de la doble cadena de ADN. *Drosophila melanogaster* no posee proteínas de la familia H2A.X y es la proteína H2Av de la familia H2A.Z la encargada de realizar su función en la reparación de las roturas del ADN (Swaminathan, 2005). La serina 137 de la proteína H2Av sufre fosforilación en el lugar donde se localiza el daño en el ADN marcándolo así y sirviendo de señal para el reclutamiento de la maquinaria de reparación del ADN (Redon, 2002).

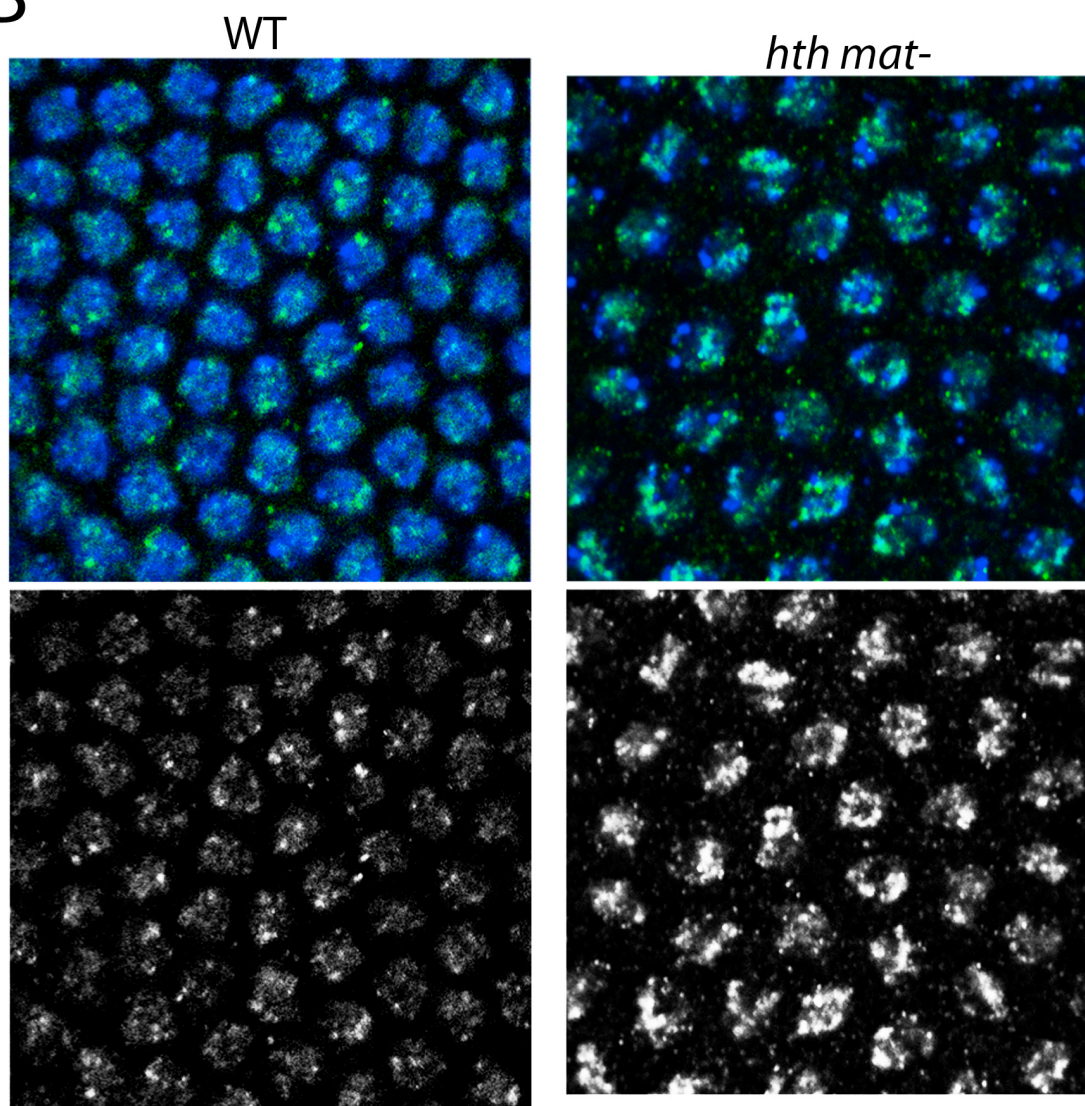
En este trabajo hemos analizado el daño y las roturas presentes en el ADN genómico para obtener una nueva evidencia de un proceso asociado a los defectos en la formación de heterocromatina. Para ello hemos realizado el marcaje inmunohistoquímico de los núcleos embrionarios con un anticuerpo α -H2AvP. Este experimento ha permitido concluir que el daño y las roturas del ADN se ven incrementadas en los núcleos de los embriones desarrollados en ausencia de Hth (Fig. R.1.1B).

FIGURA R.1.1: (A) Fragmentación del ADN nuclear durante el desarrollo embrionario temprano en ausencia del componente materno de *hth*. Tinción de ADN con TOPRO3 (azul). (B) Marcaje inmunohistoquímico de la His2AvP (verde). Incremento de las roturas de ADN en ausencia del componente materno de *hth*.

A



B



Conclusión 1: los embriones desarrollados en ausencia de Hth se caracterizan por la presencia de fragmentos de ADN dispersos en el citosol sincitial embrionario. Además, en ausencia de Homothorax las roturas y el daño en el ADN nuclear se ven incrementados.

4.1.2. Estudio del estado del ADN ribosómico en embriones desarrollados en ausencia de Hth

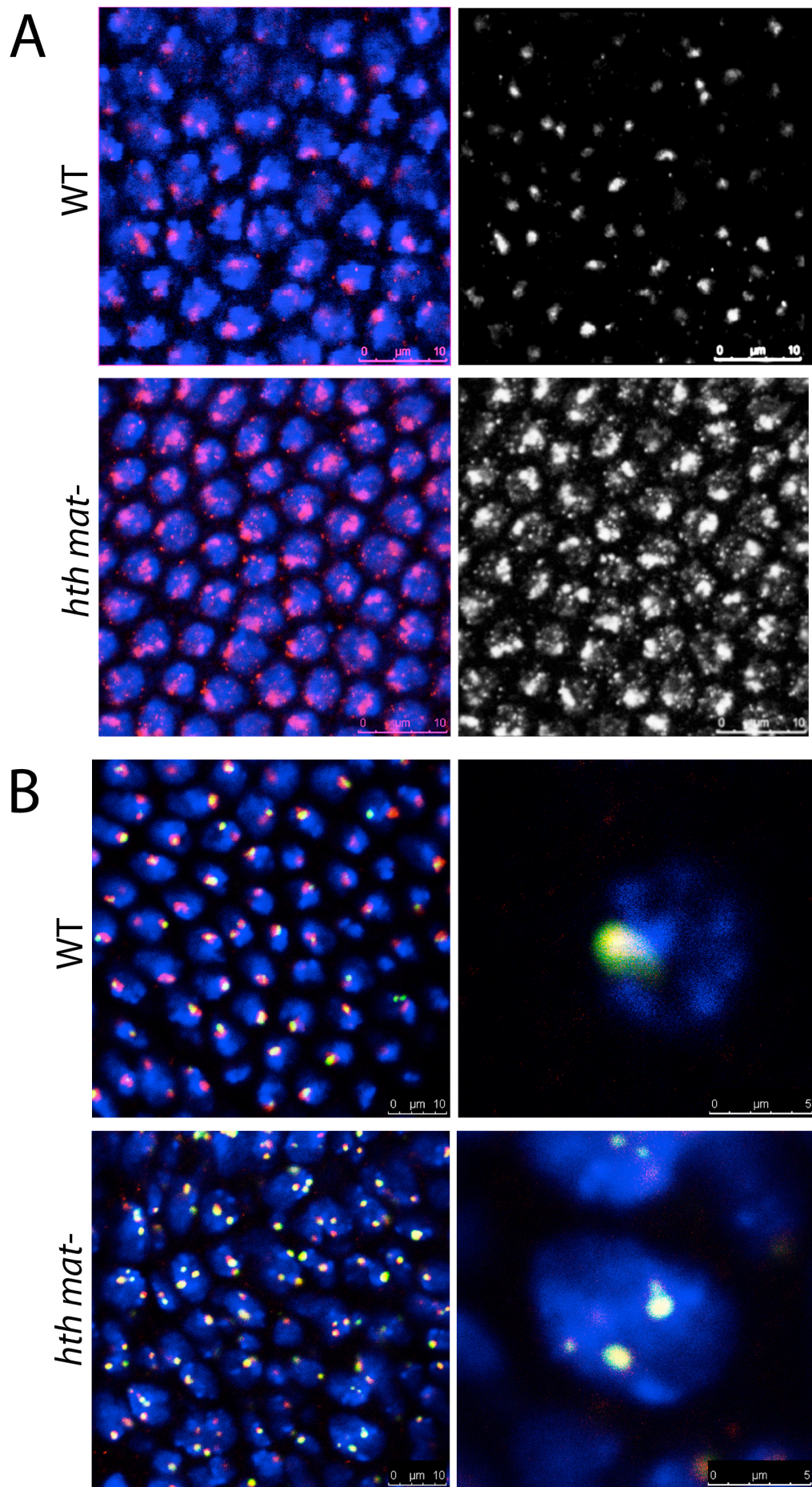
La descondensación del ADN ribosómico es uno de los fenotipos característicos de aquellas células en las que se encuentra alterado algún elemento encargado del proceso de formación de la heterocromatina constitutiva. Al verse comprometida la metilación del H3K9 o la maquinaria del ARN interferente se produce la desorganización nucleolar y la descondensación del ADN ribosómico (Peng, 2007). Los mutantes para el gen *Su(var)3-9*, encargado de la metilación del H3K9, presentan *foci* dispersos de ADN ribosómico, cada uno de los cuales da lugar a un nucléolo ectópico. Este mismo fenómeno sucede en distintos mutantes de genes que participan en la ruta del proceso de formación de la heterocromatina como son la proteína HP1 y la maquinaria del ARN interferente (Peng, 2007).

El nucléolo es visible mediante el marcaje de una proteína nucleolar denominada fibrilarina (Tollervey, 1993). El marcaje con fibrilarina en un núcleo de una célula silvestre muestra un único nucléolo de forma más o menos redondeada y regular, sin protuberancias y con un margen definido. Es posible identificar, en aquellos núcleos que hayan sufrido la replicación del ADN ribosómico, la presencia de dos nucléolos, pero estos estarán bien definidos. Cuando se tiñen con fibrilarina núcleos pertenecientes a células que poseen algún tipo de disfunción en alguno de los componentes que participan en el proceso de formación de heterocromatina, los nucléolos presentan una forma irregular. El ADN ribosómico aparece descondensado originándose nucléolos de forma irregular, con protuberancias y sin un margen definido. Puede observarse a su vez la aparición de nucléolos secundarios ectópicos que aparecen en un número variable dentro de los núcleos y poseen a su vez diversidad de tamaños y formas. Este fenotipo de desorganización nucleolar es observable mediante el marcaje de fibrilarina en los núcleos desarrollados en ausencia de Hth (Fig. R.1.2A).

El ADN ribosómico de los núcleos puede ser detectado mediante la técnica de hibridación *in situ*. Esto permite detectar los *foci* de ADN ribosómico en los núcleos y determinar si se encuentran asociados a la formación de nucleolos al colocalizar su marcaje con el de la fibrilarina. En los núcleos silvestres en los que el ADN ribosómico no ha sido replicado se observa un *foci* único de ADNr asociado al nucleolo marcado con fibrilarina. En los núcleos de células mutantes en las cuales el proceso de formación de heterocromatina se ve afectado, el ADNr se encuentra descondensado y se originan diversos *foci* de ADNr dispersos por el núcleo. Además, es importante destacar que estos *foci* dispersos originan a su vez nucleolos ectópicos secundarios y el marcaje de la fibrilarina nucleolar colocaliza con los diversos *foci* de ADNr (Peng, 2007). Al analizar los núcleos de los embriones desarrollados en ausencia de Hth se observa un fenotipo similar y comparable al fenotipo de las células que poseen alterada alguna etapa del proceso de formación de heterocromatina. La mayoría de los núcleos observados presentan un número superior a dos *foci* de ADN ribosómico. A su vez, estos *foci* dispersos de ADNr están asociados con nucleolos ectópicos de tamaño variable y forma irregular (Fig. R.1.2B).

FIGURA R.1.2: (A) Marcaje inmunohistoquímico de la fibrilarina (rojo), tinción de ADN con TOPRO3 (azul). Desorganización nucleolar en embriones desarrollados en ausencia del componente materno de *hth*. (B) Doble marcaje inmunohistoquímico de la fibrilarina (rojo) e hibridación *in situ* fluorescente de ADNr (verde). Descondensación del ADNr y formación de nucleolos ectópicos en ausencia del componente materno de *hth*.

Conclusión 2: los núcleos de los embriones desarrollados en ausencia de Hth muestran desorganización nucleolar y descondensación del ADN ribosómico. Este fenotipo es además similar y comparable al que presentan las células que poseen alterada alguna etapa del proceso de formación de heterocromatina.



4.1.3. Ensayo de accesibilidad de la DNasa I para la determinación del estado estructural de la heterocromatina en los embriones de *Drosophila melanogaster* desarrollados en ausencia de Hth

El estado estructural de la cromatina es determinante para la accesibilidad y el funcionamiento de la maquinaria de la transcripción génica. La estructura laxa de la eucromatina facilita el acceso de la maquinaria transcripcional y permite la transcripción de los genes. Por el contrario, el estado estructural altamente compactado de la heterocromatina impide el acceso de la maquinaria transcripcional a dichas regiones. Este principio es el empleado en los ensayos de accesibilidad de la DNasa I. Estos ensayos consisten en realizar una digestión enzimática restrictiva del ADN presente en los núcleos celulares. De esta forma, la actividad de la DNasa I sobre el ADN de los embriones dependerá del estado estructural de la cromatina nuclear. Por tanto, la estructura laxa de las regiones de eucromatina facilitaran el acceso y la actividad de la DNasa I sobre dichas regiones promoviendo su digestión. En contrapartida, la estructura cerrada y compacta de las regiones de heterocromatina dificultaran el acceso y la actividad de la DNasa I sobre estas regiones. El resultado final será la digestión enzimática de las regiones eucromáticas, frente a la escasa o nula degradación que sufrirán las regiones heterocromáticas. Si las regiones de heterocromatina no se forman correctamente y debido a ello presentan una estructura descondensada, la DNasa I tendrá más fácil acceso a dichas regiones y podrán ser degradadas de forma similar a las regiones de eucromatina. Así, comparando la digestión diferencial de la DNasa I sobre las regiones de heterocromatina y eucromatina de diferentes embriones, podemos determinar el grado de compactación de la heterocromatina. En caso de una disfunción en el proceso de formación de heterocromatina, la DNasa I sería capaz de digerir tanto las regiones de eucromatina abiertas como las de heterocromatina que no hayan podido ser correctamente compactadas.

Hemos realizado el ensayo de accesibilidad de DNasa I en embriones desarrollados tanto en presencia como en ausencia del factor de transcripción Hth. El ADN purificado de las muestras digeridas con DNasa I fue analizado mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Fueron analizadas diferentes regiones genómicas tanto de eucromatina como de heterocromatina y comparada su cuantificación frente a muestras de ADN de embriones sin tratar con DNasa I. Para estudiar la acción enzimática de la DNasa I sobre la eucromatina analizamos la región genómica de la actina. Para el análisis de la digestión de regiones de heterocromatina empleamos

diferentes regiones genómicas, el locus heterocromático H23 (Zhang, 2008), que abarca desde la región 22.000 a la 24.000 de la heterocromatina del cromosoma 2, el elemento transponible 1360 del cromosoma 4 (Sun, 2004), que presenta una repetición invertida terminal de ADN satélite, una región correspondiente al ADN ribosómico y 3 regiones centroméricas y pericentroméricas correspondientes a las repeticiones de ADN satélite de la familia 1.688 de 359 pb, 260 pb y 361 pb.

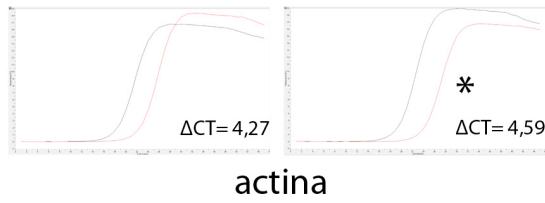
En los embriones desarrollados en presencia de Hth la DNAsa I era capaz de degradar la región eucromática correspondiente a la actina. En cambio, en todas las regiones heterocromáticas analizadas la acción enzimática de la DNAsa I está dificultada e incluso impedida. Los embriones desarrollados en ausencia de Hth presentan digestión enzimática por DNAsa I tanto de la región eucromática de actina, como de todas las regiones de heterocromatina analizadas (Fig. R.1.3). Por lo tanto, la heterocromatina de los embriones desarrollados en ausencia de Hth no se encuentra correctamente formada y las regiones heterocromáticas analizadas presentan una estructura laxa y descondensada que permite el acceso de la DNAsa I y su degradación enzimática.

FIGURA R.1.3: Ensayos de accesibilidad de la DNAsa I en distintas regiones genómicas (A) Cuantificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Variación de los ciclos de amplificación (Cts) del ADN de distintas regiones genómicas en muestras tratadas y sin tratar con DNAsa I. (B) Comparación de la digestión enzimática por DNAsa I entre embriones desarrollados en presencia y en ausencia de Hth. El eje Y representa la variación cuantificada de los ciclos de amplificación (Δ Cts) entre muestras tratadas y sin tratar con DNAsa I

Conclusión 3: en ausencia del factor de transcripción Hth todas las regiones de heterocromatina constitutiva analizadas no se forman correctamente. El proceso de formación de heterocromatina se encuentra afectado y las regiones de heterocromatina son incapaces de adquirir la estructura altamente compactada que las caracteriza. El factor de transcripción Hth es fundamental en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

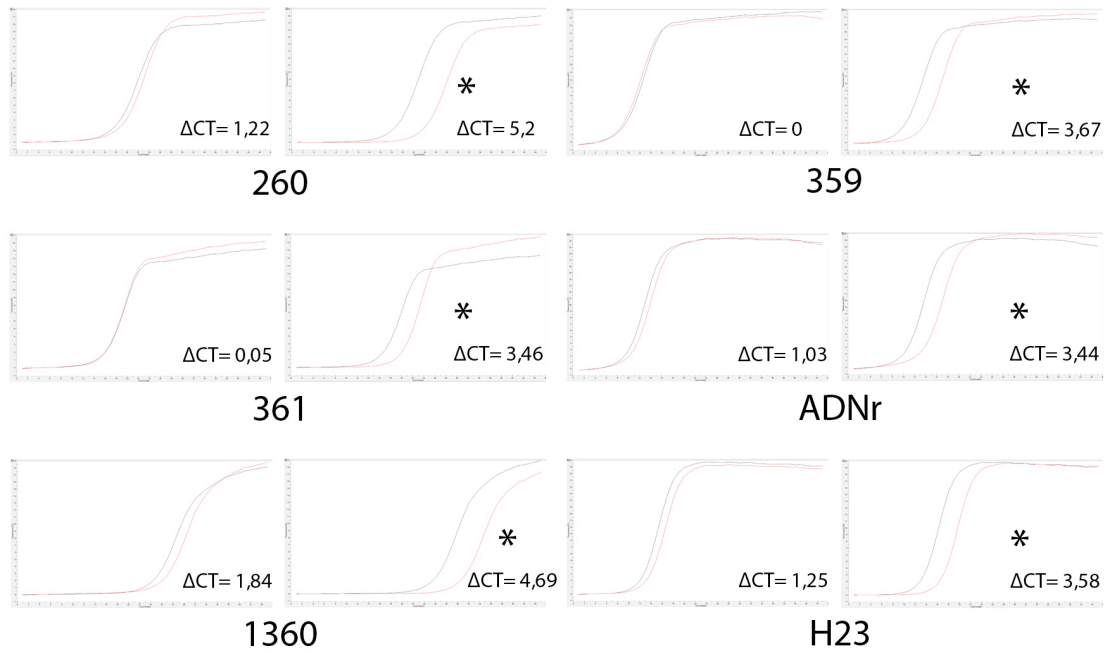
A

Región de eucromatina

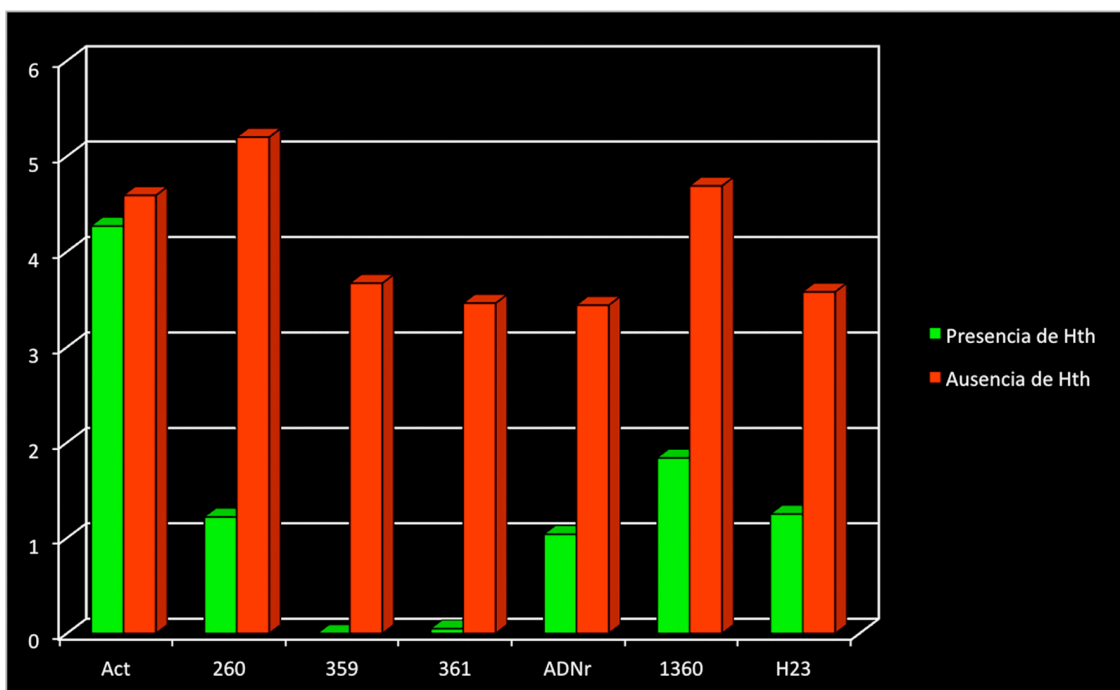


- Muestras sin tratar
- Muestras tratadas con DNase I
- * Embriones desarrollados en ausencia de Hth

Regiones de heterocromatina



B



4.2. Caracterización del estado de la ruta de modificación de histonas en embriones de *Drosophila melanogaster* desarrollados en ausencia del factor de transcripción Homothorax

El segundo objetivo de este trabajo consiste en caracterizar el estado de la ruta de modificación de histonas descrita durante el proceso de formación de la heterocromatina en embriones desarrollados en ausencia del factor de transcripción Hth.

Para abordar este objetivo se han analizado mediante tinciones inmunohistoquímicas diferentes modificaciones de histonas. Empleando anticuerpos específicos de dichas modificaciones ha sido posible comparar el estado de los diferentes procesos de modificación de histonas en embriones desarrollados en ausencia o presencia de Hth.

4.2.1. El proceso de reemplazo de la histona H2 por su variante H2Av en ausencia de Hth

Según ha sido descrito (Swaminathan, 2005), el primer paso en la formación de la heterocromatina en *D. melanogaster* es el intercambio o reemplazo de la histona H2A por su variante, la histona H2Av. Este proceso permite la modificación estructural de los nucleosomas y establece un mecanismo para el control transcripcional. La gran relevancia epigenética de esta modificación estructural de la cromatina reside en posibilitar la acción de las proteínas HDACs y HMTs permitiendo que estas tengan acceso a los extremos amino-terminales para introducir las diferentes modificaciones epigenéticas. Para el análisis del proceso de reemplazo de la histona H2A por la histona H2Av ha sido realizada una tinción inmunohistoquímica empleando anticuerpo α -H2Av y el ADN nuclear ha sido teñido mediante TOPRO3. Este marcaje nos permite comparar los núcleos de los embriones durante su desarrollo en presencia y en ausencia de Homothorax.

La distribución de la histona H2Av en los núcleos de ambos tipos de embriones es similar (Fig. R2.1). El experimento realizado pone de manifiesto que el reemplazo de la histona H2A por la histona H2Av sucede correctamente tanto en presencia como en ausencia de Hth, por lo que ha sido posible concluir que el gen *homothorax* no se

ve implicado en dicho proceso epigenético y su función ha de ser relevante en procesos posteriores durante la ruta de modificación de histonas.

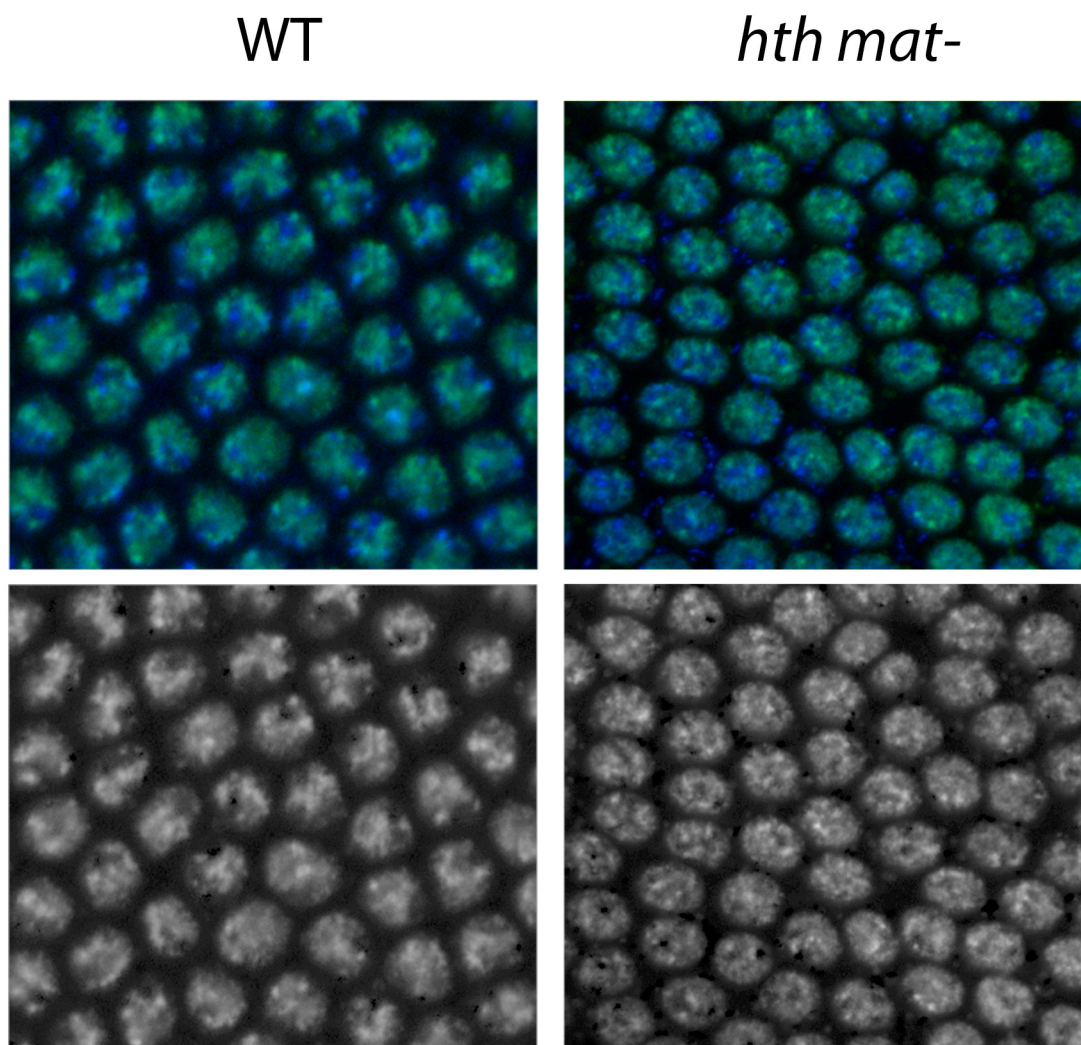


FIGURA R.2.1: Marcaje inmunohistoquímico de la His2AvP (verde), tinción de ADN con TOPRO3 (azul).

Conclusión 4: el proceso de reemplazo de la histona H2A por su variante la histona H2Av sucede correctamente en embriones desarrollados en ausencia de Hth.

4.2.2. El proceso de acetilación del H4K12 en ausencia de Hth

El siguiente proceso descrito durante la ruta de modificación de histonas tras el reemplazo de la histona H2A por la histona H2Av es la acetilación del residuo 12 de lisina de la histona H4. Se ha sugerido que este evento podría ayudar al reclutamiento de una proteína HDAC encargada de desacetilar el H3K9 de forma previa a su metilación por la Su(var)3-9 (Swaminathan, 2005).

Para el análisis del proceso de acetilación del H4K12 se han realizado tinciones inmunohistoquímicas con un anticuerpo α -H4K12 acetilado y el ADN nuclear ha sido teñido mediante TOPRO3. Este marcaje nos ha permitido comparar los núcleos de los embriones durante su desarrollo en presencia y en ausencia de Homothorax. La acetilación del H4K12 en los núcleos de ambos tipos de embriones es similar tanto en presencia como en ausencia de Hth. Durante el desarrollo temprano destaca la presencia de esta modificación epigenética colocalizando en los núcleos con las regiones de heterocromatina densamente teñidas mediante TOPRO3. Como era esperado según lo previamente descrito (Swaminathan, 2005) el marcaje del H4K12 acetilado se visualiza asociado a regiones de heterocromatina, permaneciendo de este modo las regiones de eucromatina de los núcleos libres de este marcaje (Fig. R2.2A). El experimento realizado pone de manifiesto que la acetilación del H4K12 tiene lugar correctamente tanto en presencia como en ausencia de Hth. Por ello, es posible concluir que la función del gen *homothorax* no interviene en dicho proceso epigenético.

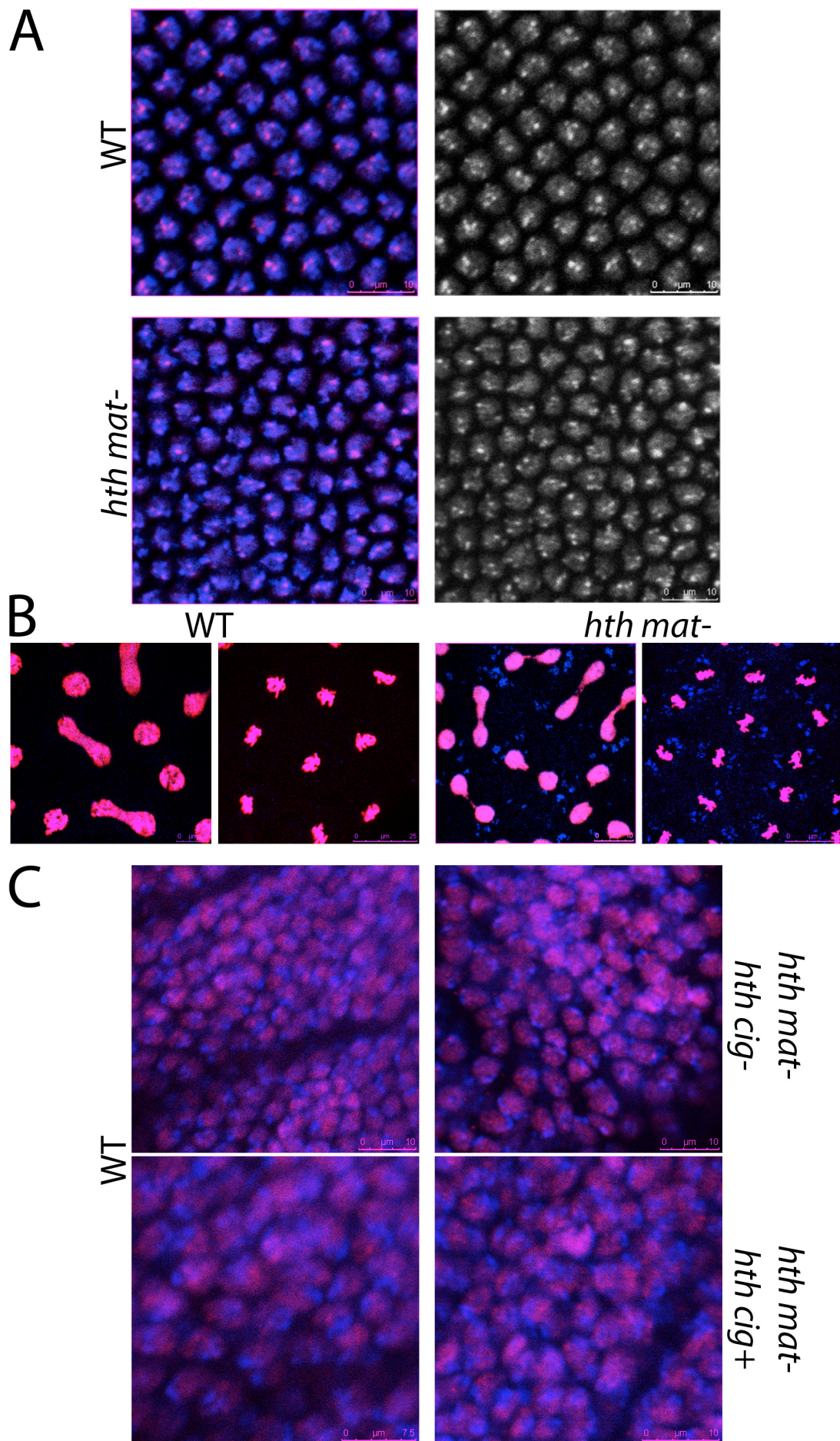
Pese a no haber encontrado diferencias en la acetilación del H4K12 en presencia o ausencia de Hth, es posible destacar algunas particularidades de dicho proceso epigenético durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* que previamente no han sido descritas. Durante las mitosis sincitiales los cromosomas metafásicos aparecen teñidos con el anticuerpo α -H4K12 acetilado. Esta modificación epigenética podría ser de relevancia para la correcta compactación del ADN durante las divisiones mitóticas del desarrollo embrionario temprano (Fig. R2.2B).

Otra particularidad observada es que, si bien durante el desarrollo temprano el marcaje del H4K12 acetilado se asocia a las regiones de heterocromatina, según progresa el desarrollo embrionario esto deja de ser así. En fases más avanzadas del desarrollo embrionario, una vez ha tenido lugar la celularización embrionaria, la acetilación del H4K12 se encuentra excluida de las regiones de heterocromatina y asociada únicamente a las regiones de eucromatina que aparecen ligeramente teñidas

por el TOPRO3 (Fig. R2.2C). Esta observación sugiere que la acetilación del H4K12 puede no ser necesaria en el proceso de formación de heterocromatina en fases más tardías del desarrollo embrionario. A su vez este evento pone en evidencia la plasticidad de los procesos epigenéticos a lo largo del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

FIGURA R.2.2: (A) Marcaje inmunohistoquímico del H4K12 acetilado durante el desarrollo temprano (rojo), tinción de ADN con TOPRO3 (azul). (B) Marcaje inmunohistoquímico del H4K12 acetilado en el desarrollo temprano durante la mitosis. (C) Marcaje inmunohistoquímico del H4K12 acetilado en el embrión celularizado. La acetilación del H4K12 deja de estar asociada a las regiones de heterocromatina densamente teñidas con TOPRO3.

Conclusión 5: el proceso de acetilación del H4K12 sucede correctamente en embriones desarrollados en ausencia de Hth. Es destacable que esta modificación epigenética se asocia a regiones de heterocromatina únicamente durante el desarrollo embrionario sincitial temprano.



4.2.3. El proceso de metilación del H3K9 en ausencia de Hth

Según la ruta de modificación de histonas que ha sido descrita durante el proceso de formación de heterocromatina en *D. melanogaster* (Swaminathan, 2005), tras el reemplazo de la histona H2A por su variante, la histona H2Av, y la subsiguiente acetilación del H4K12, tendría lugar la metilación del residuo 9 de lisina de la histona H3. Este proceso epigenético es probablemente el mejor conocido y estudiado durante la formación de la heterocromatina y la trimetilación del H3K9 constituye el núcleo central de evidencia para la caracterización de las regiones de heterocromatina del genoma. La metilación del H3K9 origina un lugar de unión para la proteína HP1, la cual es reclutada posibilitándose la densa compactación de la heterocromatina.

Para el análisis del proceso de metilación del H3K9 ha sido realizada la tinción inmunohistoquímica de los núcleos embrionarios. El marcaje de los núcleos ha sido llevado a cabo empleando anticuerpo α -H3K9 trimetilado y dimetilado. El ADN nuclear ha sido teñido con TOPRO3. Este marcaje nos ha permitido comparar los núcleos de los embriones durante su desarrollo en presencia y en ausencia de Hth. Además, para la cuantificación molecular de los niveles de los residuos 9 de lisina metilados de las histonas H3, ha sido realizado un análisis mediante *western blot* de los embriones desarrollados en presencia y en ausencia de Hth.

El análisis inmunohistoquímico de la trimetilación del H3K9 en los núcleos de ambos tipos de embriones pone de manifiesto la disminución de sus niveles ausencia de Hth. A su vez, en ausencia de Hth, se observa una deslocalización de dicha marca epigenética. Mientras que los embriones desarrollados en presencia de Hth muestran una clara tinción de la trimetilación del H3K9 asociada con las regiones densamente teñidas con TOPRO3 de heterocromatina, los embriones desarrollados en ausencia de Hth muestran gran cantidad de núcleos que carecen de la marca epigenética de la trimetilación del H3K9. Pese a encontrarse ausente en gran cantidad de núcleos, es importante señalar que en los núcleos en los que es posible apreciar el marcaje del H3K9 trimetilado, esta tinción aparece difusa y no muestra un grado correcto de colocación con las regiones densamente teñidas mediante TOPRO3 de heterocromatina (Fig. R2.3A).

Debido a la complejidad descrita del proceso de la metilación del H3K9 (Rudolph, 2007), dicho evento epigenético fue estudiado con mayor profundidad y detalle en los embriones desarrollados en ausencia de Hth. Según ha sido descrito,

para que la correcta trimetilación del H3K9 pueda tener lugar, han de ocurrir de forma precedente una serie de modificaciones epigenéticas de la histona H3. El residuo 9 de lisina de la histona H3 (H3K9) ha de ser previamente desacetilado por intervención de la proteína HDAC Rpd3. A su vez, ha de producirse la desmetilación del residuo 4 de lisina de la histona H3 (H3K4) catalizada por la proteína Su(var)3-3. La metilación del H3K9, llevada a cabo por la proteína HMT Su(var)3-9, tiene lugar de forma secuencial y antes de poder alcanzar un estado trimetilado, el H3K9 debe de ser dimetilado.

Para descartar que la incorrecta trimetilación del H3K9 pueda deberse a diferencias en los niveles presentes de las proteínas Rpd3, Su(var)3-3 y Su(var)3-9 en los embriones tempranos de *D. melanogaster* que carecen del aporte de Hth, se llevo a cabo la cuantificación de todas estas enzimas mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Este experimento reveló que los embriones desarrollados tanto en presencia como en ausencia de Hth poseían niveles similares de todas estas proteínas. Al no poderse demostrar niveles diferentes de las proteínas encargadas de llevar a cabo las modificaciones epigenéticas de la histona H3, fue posible asegurar que la disfunción en el proceso de trimetilación del H3K9 debía ser atribuido a la ausencia de Hth. De igual forma se descarta la posibilidad de que el gen *homothorax* se encuentre implicado en la regulación de los niveles presentes de Rpd3, Su(var)3-3 y Su(var)3-9.

El marcaje inmunohistoquímico de la dimetilación del H3K9 permite analizar el estado de dichos residuos de las histonas H3 de forma previa a que se produzca la trimetilación de los mismos. En los embriones desarrollados en ausencia de Hth se observa un aumento en la presencia de esta marca epigenética. Tanto en presencia como en ausencia de Hth la dimetilación del H3K9 puede llevarse a cabo y es patente en los núcleos de los embriones en desarrollo. La dimetilación del H3K9 aparece en ambos tipos de embriones colocalizando y asociada a las regiones de heterocromatina densamente teñidas mediante TOPRO3. Sin embargo, los niveles observados mediante el análisis inmunohistoquímico de los embriones desarrollados en ausencia de Hth son anormalmente elevados. Este aumento en los niveles de dimetilación del H3K9 podrían deberse y ser consecuencia de la incapacidad que presentan los embriones desarrollados en ausencia de Hth para llevar a cabo de forma correcta la metilación final que permite a los residuos 9 de lisina de las histonas H3 alcanzar el estado de trimetilación (Fig. R2.3B).

Ha sido descrito que la metilación del H3K9 en el embrión de *D. melanogaster* son por primera vez observables en los núcleos del ciclo de división nuclear 14

(Rudolph, 2007). En dicho ciclo se origina el blastodermo celular y la metilación del H3K4 queda restringida al compartimento eucromático del núcleo. A su vez, en el dominio nuclear de la heterocromatina puede visualizarse por vez primera la metilación del H3K9. De esta forma, se establece en el dominio apical de los núcleos las regiones de heterocromatina gracias a la compactación final promovida por la aparición de residuos de lisina 9 de las histonas H3 que permitirán el reclutamiento de la proteína HP1. En presencia del componente materno de *homothorax* es fácilmente observable la aparición de la trimetilación del H3K9 en el dominio apical del núcleo, asociándose y colocalizando con el compartimento nuclear de la heterocromatina. En ausencia del componente materno de *homothorax* y alcanzado el estadio de división nuclear 14 no es posible apreciar la presencia de H3K9 trimetilado en la cromatina (Fig. R2.3C). Por ello es posible concluir que la presencia de Hth durante el desarrollo temprano sincitial es necesaria e imprescindible para desencadenar la trimetilación temprana del H3K9 de forma coordinada con la organización temporal establecida.

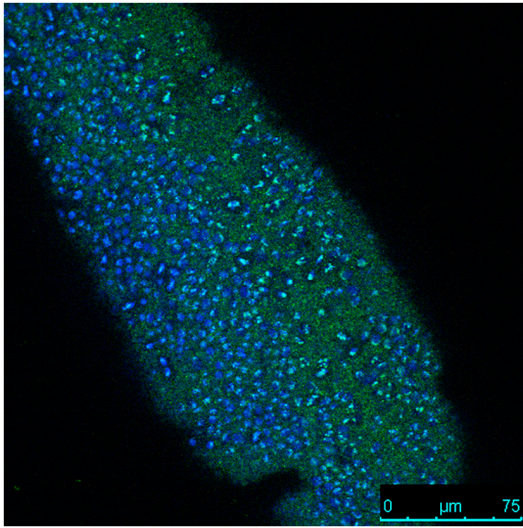
Hemos analizado también la dinámica del proceso de la trimetilación del H3K9 en ausencia de Hth a lo largo del desarrollo embrionario. Si bien en ausencia del componente materno la trimetilación temprana del H3K9 se ve impedida, el proceso de trimetilación es parcialmente recuperado a lo largo del desarrollo embrionario. Cabe destacar que esto sucede incluso en ausencia del componente cigótico de *homothorax*, es decir en aquellos embriones que se han desarrollado en ausencia total de Hth (Fig. R2.3D). El rescate de la trimetilación del H3K9 en ausencia total de Hth es únicamente parcial ya que el marcaje inmunohistoquímico presentado por dichos embriones es difuso, no se asocia de forma correcta a las regiones de heterocromatina y no es observable en todos los núcleos (Fig. R2.3D). La presencia del componente materno de Hth es de vital relevancia para la correcta trimetilación del H3K9. Los embriones que no se hayan desarrollado durante sus primeros estadios en presencia del componente materno de *homothorax*, incluso siendo capaces de generar mediante transcripción cigótica proteína Hth, presentarán dificultades para la correcta trimetilación del H3K9 y los niveles y disposición de esta marca epigenética no son equiparables a la trimetilación del H3K9 observada en embriones desarrollados en presencia de Hth a lo largo de todo su proceso de desarrollo (Fig. R2.3D). La recuperación observada del proceso de trimetilación ha de ser independiente de la función de *homothorax* y pone de manifiesto la complejidad del proceso de metilación del H3K9.

La cuantificación de la metilación de los residuos H3K9 ha sido realizada mediante un análisis por *western blot*. Se ha realizado la extracción de las histonas constituyentes de la cromatina de los núcleos de los embriones en desarrollo en presencia y en ausencia de Hth. Mediante este ensayo no se han encontrado diferencias equiparables en los niveles de dimetilación del H3K9 previamente observados mediante el marcaje inmunohistoquímico entre embriones desarrollados en presencia y en ausencia de Hth. En cambio, las variaciones en los niveles de trimetilación del H3K9 han podido ser verificados. Los embriones desarrollados en ausencia de Hth muestran una reducción en los niveles de trimetilación de los residuos H3K9 presentes en los núcleos embrionarios (Fig. R2.3E). Es posible explicar este resultado debido a que la extracción de las histonas ha sido llevada a cabo una vez que la recuperación de la trimetilación del H3K9, por una vía independiente de la función de Hth, ha tenido lugar. De esta forma es razonable no haber observado una disminución más drástica de la trimetilación del H3K9 y una mayor acumulación de la dimetilación del H3K9 en los embriones desarrollados en ausencia de Hth.

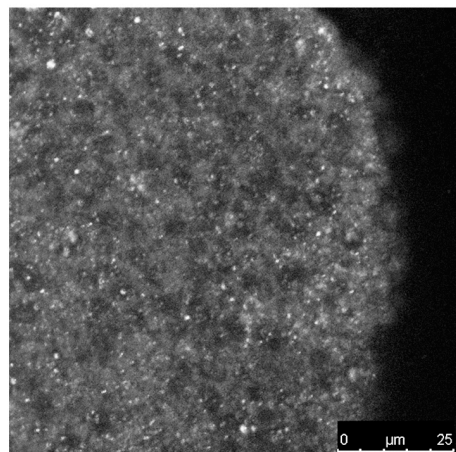
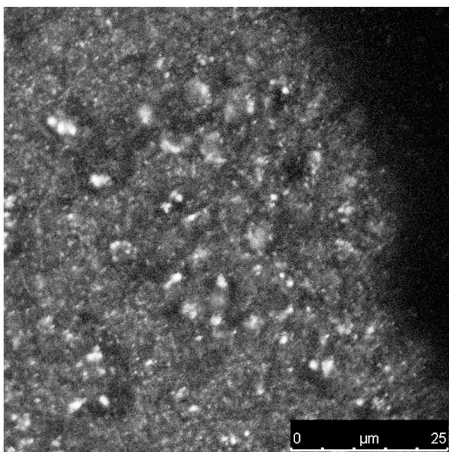
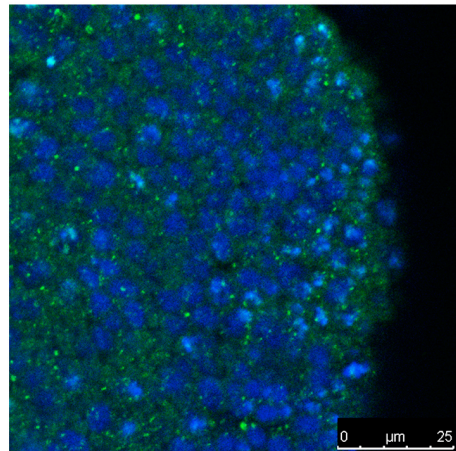
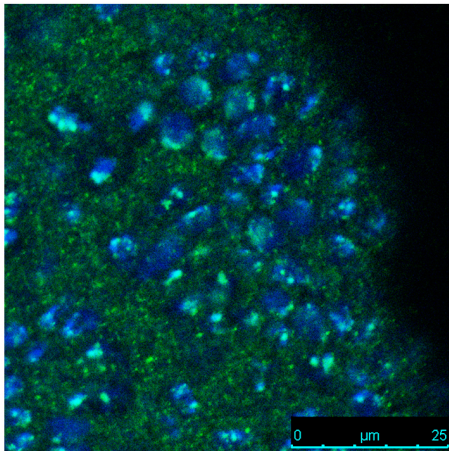
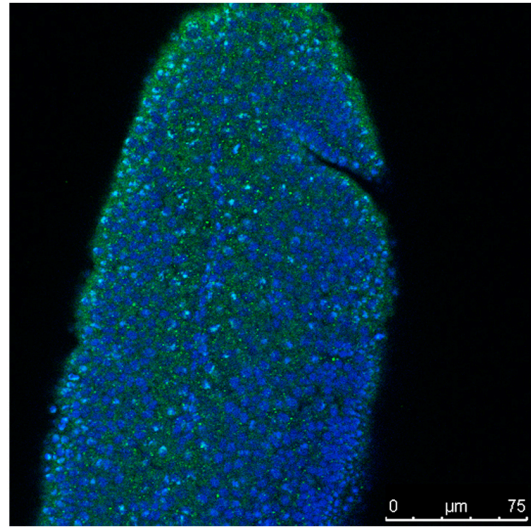
FIGURA R.2.3: (A) Trimetilación del H3K9 (verde) en embriones desarrollados en presencia y en ausencia de Hth. Tinción de ADN con TOPRO3. Los niveles de trimetilación del H3K9 están reducidos en ausencia de Hth. (B) Dimetilación del H3K9 (verde) en embriones desarrollados en presencia y en ausencia de Hth. Tinción de ADN con TOPRO3. La dimetilación del H3K9 se acumula en ausencia de Hth. (C) Trimetilación del H3K9 (verde) durante el desarrollo temprano en presencia y en ausencia de Hth. Tinción de ADN con TOPRO3. En ausencia de Hth la trimetilación del H3K9 no se aprecia al no ocurrir de forma coordinada con la organización temporal establecida. (D) Trimetilación del H3K9 (rojo), GFP (verde), tinción de ADN con TOPRO3. Recuperación de la trimetilación del H3K9 durante el desarrollo embrionario en ausencia de Hth. Ambos embriones se han desarrollado en ausencia del componente materno de *hth*. El embrión GFP positivo expresa el componente cigótico de *hth*, el GFP negativo no. La flecha denota la presencia de núcleos que carecen de la trimetilación del H3K9. Los niveles de H3K9 están reducidos y el marcaje es difuso, comparar con el marcaje de la trimetilación en embriones WT (fig. R.2.3.A). (E) Análisis y cuantificación mediante *western blot* de los niveles de trimetilación y dimetilación del H3K9 en embriones desarrollados en presencia y en ausencia de Hth.

A

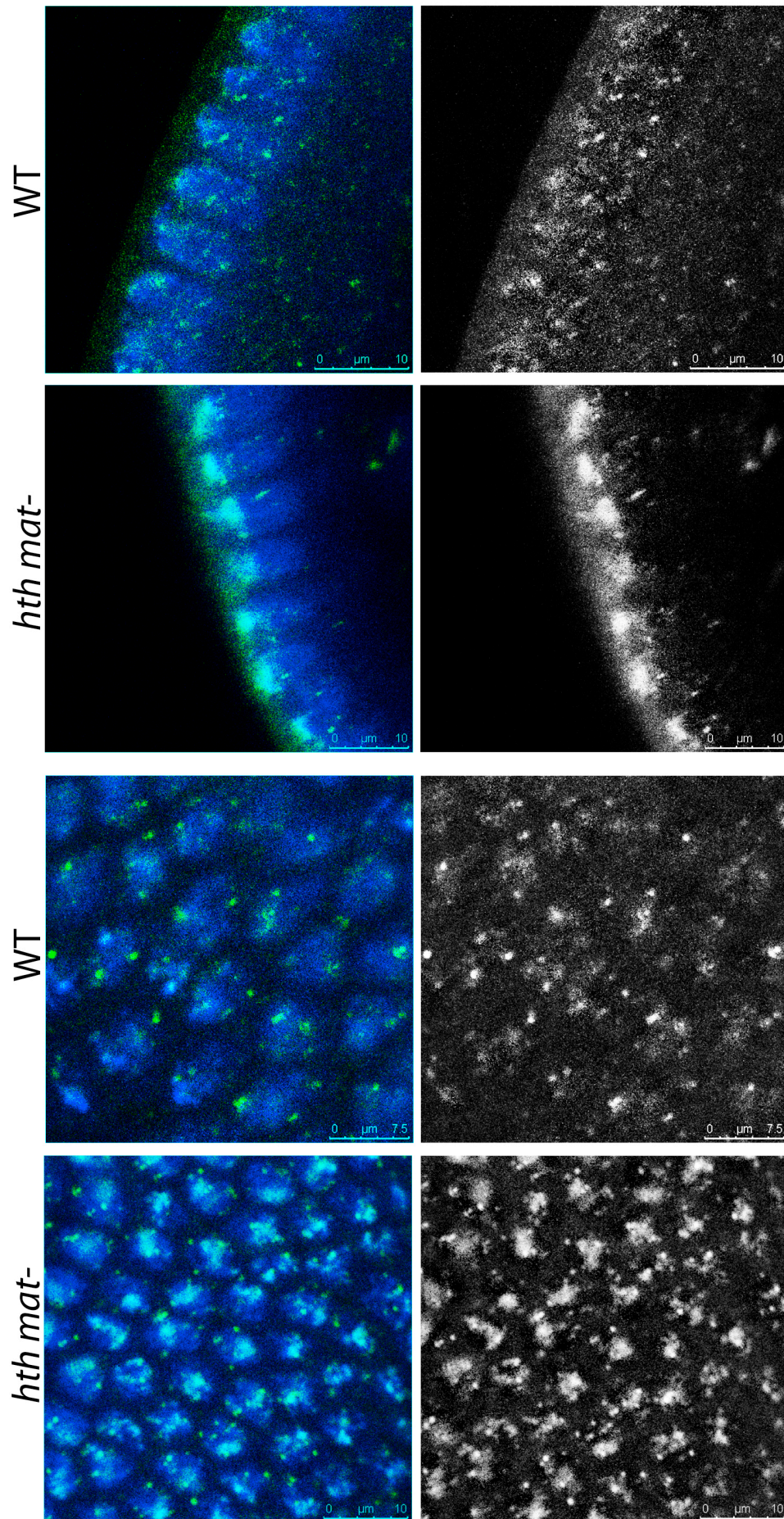
WT

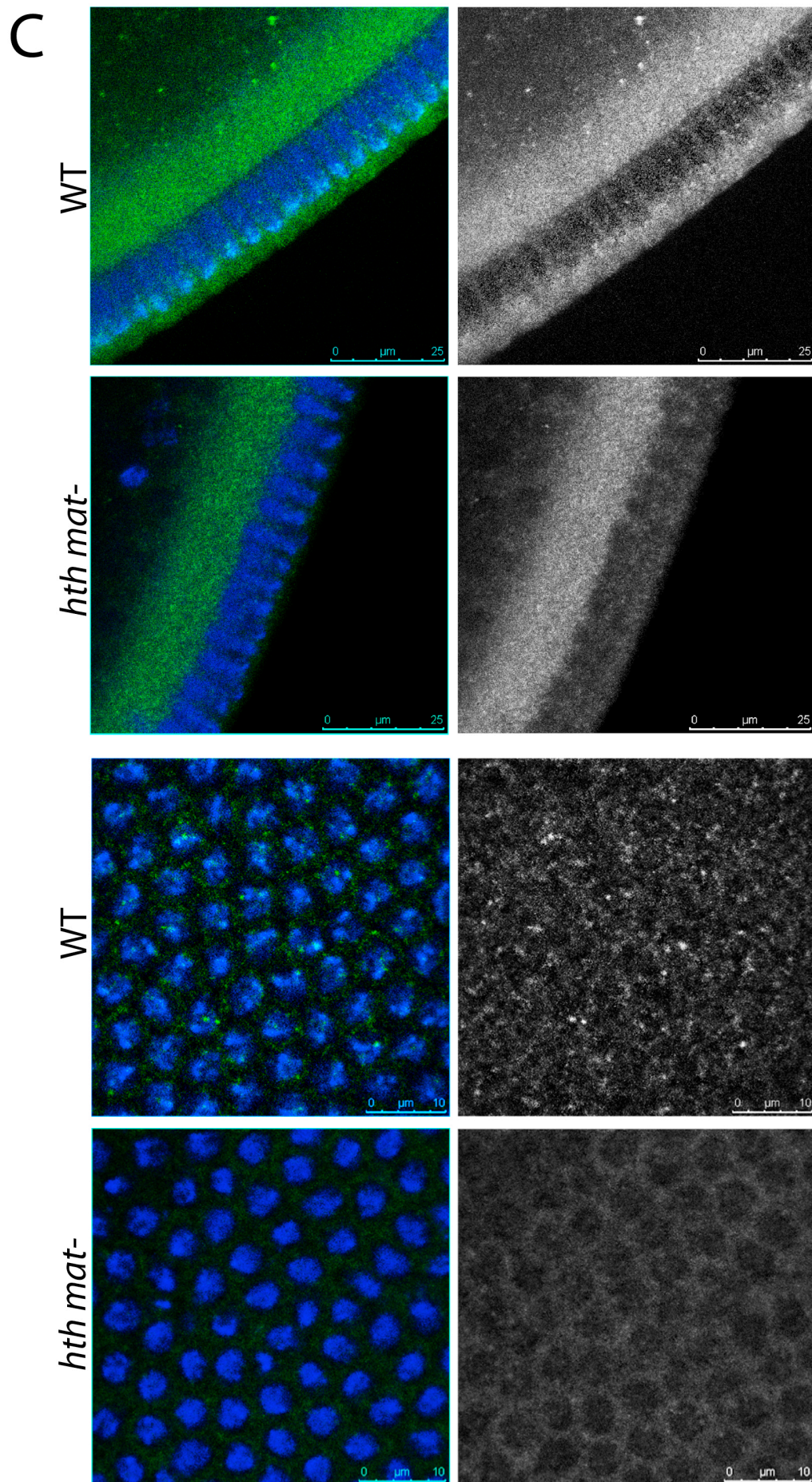


hth -

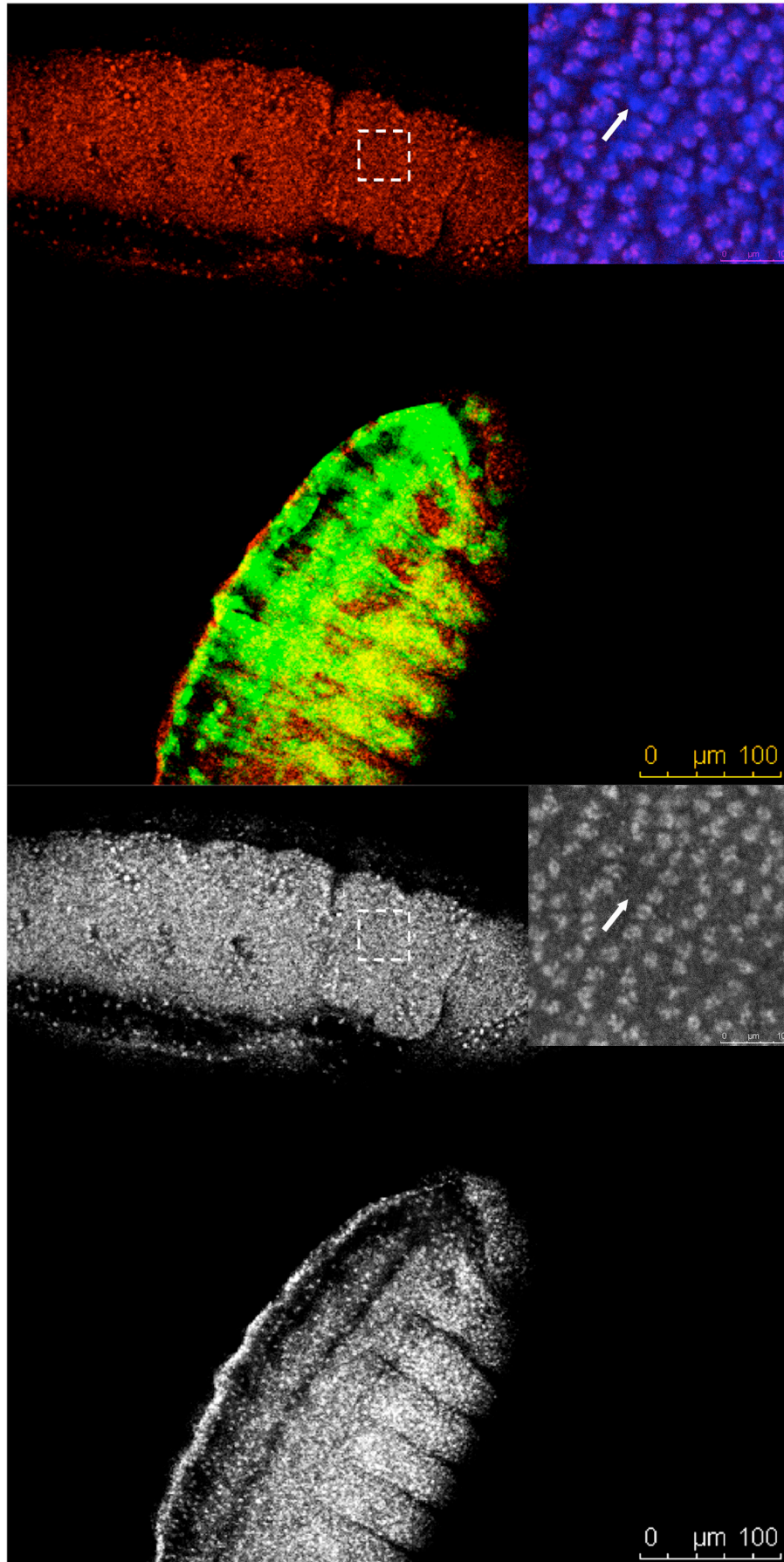


B

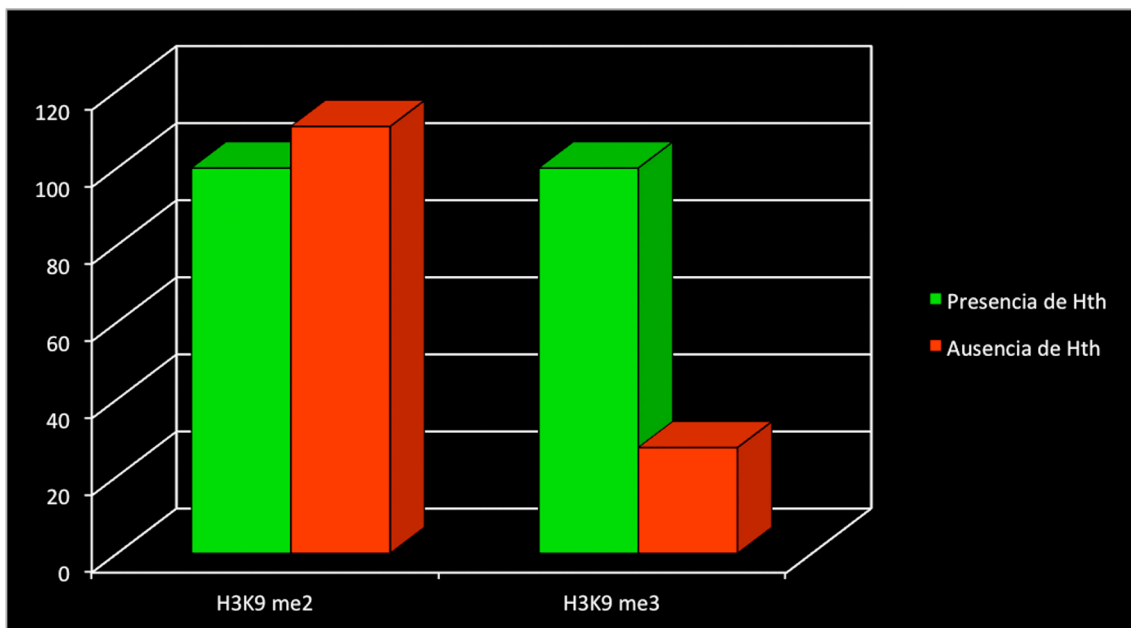




D



E



Conclusión 6: el proceso de trimetilación del H3K9 se ve alterado en ausencia del factor de transcripción Hth. Se observa una patente reducción en los niveles de trimetilación del H3K9. Esta marca epigenética no es apreciable en un alto número de núcleos y se observa difusa y no se asocia correctamente con las regiones de heterocromatina. La presencia de Hth es crítica durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* para la correcta trimetilación del H3K9.

Conclusión 7: la presencia del factor de transcripción Hth durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* no es necesaria para que la dimetilación del H3K9 pueda llevarse a cabo. En ausencia de Hth, la dimetilación del H3K9 parece acumularse en los núcleos del embrión en desarrollo. Es posible que esta

acumulación de residuos H3K9 dimetilados se deba a la imposibilidad de llevar a cabo correctamente la trimetilación de los mismos.

Conclusión 8: la presencia de Hth durante el desarrollo temprano sincitial es necesaria e imprescindible para desencadenar la trimetilación temprana del H3K9 de forma coordinada con la organización temporal establecida.

Conclusión 9: La trimetilación del H3K9 es parcialmente recuperada a lo largo del desarrollo embrionario por una vía independiente de la función del gen *hth*. Los embriones desarrollados en ausencia total de Hth acaban mostrando trimetilación de los residuos H3K9. Sin embargo, los niveles de la trimetilación del H3K9 en estos embriones se ve reducida, no es apreciable en todos los núcleos y aparece difusa mostrando una asociación defectiva con las regiones de heterocromatina.

4.3. Análisis de la función molecular del factor de transcripción Homothorax en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*

El tercer objetivo de este trabajo consiste en analizar el mecanismo de acción molecular desempeñado por el factor de transcripción Hth en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

Para abordar este objetivo se han llevado a cabo diferentes aproximaciones. Se ha realizado el análisis *in silico* de las secuencias genómicas de diferentes regiones de heterocromatina centromérica y pericentromérica para identificar la existencia de posibles lugares de unión del factor de transcripción Hth en las secuencias de ADN de dichas regiones. Se han realizado ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (CHIPs) para observar la unión e interacción directa *in vivo* del factor de transcripción Hth con diferentes regiones genómicas de heterocromatina. Finalmente, se ha realizado la cuantificación relativa de la transcripción de distintas secuencias satélite repetidas entre embriones desarrollado en presencia y en ausencia de Hth.

Este bloque de experimentación permitirá una mejor comprensión del mecanismo por el cual Hth actúa en el proceso de formación de la heterocromatina y la relación existente entre la función del gen *homothorax* y su influencia en la ruta de modificación de histonas.

4.3.1. Análisis *in silico* de secuencias de unión a ADN del factor de transcripción Hth en las regiones de heterocromatina centromérica y pericentromérica

Ha sido demostrado que la transcripción de las regiones centroméricas y pericentroméricas correspondientes a las repeticiones de ADN satélite de la familia 1.688 de 359 pb, 260 pb y 361 pb se encuentran bajo el control y procesamiento de la maquinaria del ARN interferente, generándose a partir de dichas secuencias ARNs de interferencia cortos (siRNAs) (Usakin, 2007). Una hipótesis plausible sería relacionar la formación de estos ARNs no codificantes con el proceso de formación de la heterocromatina centromérica y pericentromérica de forma similar a lo descrito en levaduras.

Durante el desarrollo embrionario temprano de *D. melanogaster*, en un contexto sincitial, Hth actúa con la ARN polimerasa II facilitando la transcripción de secuencias de ADN satélite repetido. Los transcritos de estas secuencias serían necesarios para el correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica (Salvany, 2009). En concreto se analizó la transcripción de la región centromérica del cromosoma X compuesta por una repetición de 359 pb de ADN satélite. De esta forma, el gen *homothorax* estaría capacitando el correcto acoplamiento de la heterocromatina centromérica durante las divisiones preblastodérmicas del desarrollo embrionario temprano (Salvany, 2009).

Debido a que el factor de transcripción Hth es capaz de unir ADN mediante su homeodominio y que su presencia es determinante para la correcta transcripción durante el desarrollo temprano sincitial de la región 359 de ADN satélite centromérico del cromosoma X, se realizó el análisis *in silico* de las secuencias genómicas de diferentes regiones de heterocromatina para identificar la existencia de posibles lugares de unión del factor de transcripción Hth en el ADN de dichas regiones. Además de la secuencia de ADN satélite repetido de 359 pb, se analizaron las secuencias del ADN satélite repetido de 260 pb y 361 pb, las cuales forman parte de cromosomas 2L y 3L respectivamente. Se llevó también a cabo la búsqueda de

posibles lugares de unión de Exd en las secuencias genómicas del ADN satélite. En las secuencias genómicas de las regiones correspondientes a las diferentes repeticiones de ADN satélite de la familia 1.688 analizadas, se encontraron posibles lugares de unión de los factores de transcripción Hth y Exd. Todas las regiones de ADN satélite analizadas presentan en su secuencia el motivo de unión a ADN reconocido por el dímero formado por Hth-Exd, siendo este la secuencia nucleotídica TGATGAC (Fig. R3.1). De igual forma, podemos encontrar un número elevado de secuencias nucleotídicas de unión para los factores de transcripción Hth y Exd de forma individualizada y dispersas. El factor de transcripción Hth reconoce el motivo de unión Hth/Meis representado por la secuencia nucleotídica TGAC. Por su parte, el factor de transcripción Exd reconoce la secuencia nucleotídica de unión TGAT (Fig. R3.1).

FIGURA R.3.1: Localización de las secuencias de unión a ADN de los factores de transcripción Hth y Exd presentes en las regiones de ADN satélite analizadas

Conclusión 10: existen secuencias de unión a ADN reconocidas por los factores de transcripción Hth y Exd, así como de los dímeros Hth-Exd en las repeticiones de ADN satélite de la familia 1.688 de 260 pb, 359 pb y 361 pb.

Secuencias de unión a ADN de los factores de transcripción Hth y Exd

260 pb:

agctcgtaattaaattccaaagaaactgtgttcaacaatgaaattacatttttggcatatttgc
aaattt**tgatgac**cccccttcaaaaaatgcgaaaattaacccaaaaat**tgatt**ccctaaatc
cttcaaaaagtaaataacaagttttggcaaaatccgtatccctaatttcg**gtca**ttaaata**atc**
agtttttggcacaactttaaaaaataattgttgaatatggaat**gtca**tacctcgctgagctcgta
attaaattccaatgaaactgtgttcaacaat

359 pb:

gtcatatagatgtaagaataacagttttgagcagctaattaccactgctaactatccctataac
tttt**tgac**ggggtttgggaaattaatttttggtaaattttgcatttttgaaggggtaac**atcatca**
aaatttgcaaaaaat**tgacaa**aaaatagaatgtccgtttttaactcaatt**tgattgga**aattta
attacgagctcaacgaggtat**tgac**attctatattcagacaattatttttaagttgtggcaaaaaa
accgcttatt**tgatgac**cgaaattcagaaaaaccgattttgccaaaaagt**tgat**atttcaaaa
cggaattttc**gtca**taacatggctaaaaatgctcatatagatgtaaaaaataactgtttgagcag
ctaattacc

361 pb:

ggaat**gtca**tacctcgttgagcttgaataaaaatt**tccaatcaa**actgtgttcaaaaaatgaaaa
ttaaattttttgtgcatttttccaaatttt**tgatgac**cctta**tgac**ccttacaaaaaatgcgaaaat
tgacccaaaat**tgat**ctacctaataatctcaaaaag**tgat**agggatcgtagcgctggaatta
gtttctcaaaacagttattcttgcatctata**tgac**catttttagccaagtta**tgacaa**aaattccggt
tgtaaat**atca**acttttgccaaaatccggtttccaagtttcg**gtcatca**aaca**atca**gttctt**ttg**
tcacaactttaaaaaataattgtctgaatatggaatgccatacctcgttgagcttgaataaaaattt
cc

<p>Hth:</p> <ul style="list-style-type: none"> - TGAC - GTCA - [T,G]TGTC[A,C] - [G,T]GACA[C,A] 	<p>Exd:</p> <ul style="list-style-type: none"> - TGAT - ATCA - TCCAATCAA - TTGATTGGA
---	---

4.3.2. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (CHIPs) de regiones de heterocromatina constitutiva

Ha sido demostrado que el factor de transcripción Hth se une de forma activa a la cromatina de la región centromérica de ADN satélite repetido de 359 pb. Dicha región aparecía enriquecida al llevar a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina de los embriones empleando un anticuerpo α -Hth (Salvany, 2009).

El análisis *in silico* realizado ha revelado que no solo la secuencia de la repetición de 359 pb de la región centromérica del cromosoma X contiene posibles lugares de unión del factor de transcripción Hth, las repeticiones de 260 pb y 361 pb de los cromosomas 2 y 3, y que cuya transcripción al igual que la transcripción de la repetición de ADN satélite de 359 pb están sometidas al procesamiento de la maquinaria del ARN interferente (Usakin, 2007), están enriquecidas en la presencia de posibles secuencias de unión al factor de transcripción Hth. Debido a ello, se han realizado ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para dictaminar con certeza la unión activa de la proteína Hth a dichas regiones heterocromáticas *in vivo*. Previamente, en este trabajo, se ha mostrado que la región del ADN ribosómico no se forma correctamente en ausencia de Hth. Debido a esto, la posible interacción y unión del factor de transcripción Hth a dicha región de cromatina ha sido también analizada mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina.

La cuantificación absoluta de las regiones de cromatina inmunoprecipitadas muestra un enriquecimiento de todas las regiones de heterocromatina centromérica y pericentromérica analizadas, así como de la región del ADN ribosómico. Lo mismo es observable para la región control de una región potenciadora de la expresión (*enhancer*) del gen *labial*, a la cual según ha sido descrito (Ryoo, 1999) se une activamente el factor de transcripción Hth. En cambio, no se observa el enriquecimiento de la secuencia control del gen de la actina (*act5C*) a la cual no se espera unión alguna por parte de la proteína Hth (Fig. R3.2).

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina nos han permitido constatar la unión *in vivo* del factor de transcripción Hth a diferentes regiones de heterocromatina constitutiva que presentaban indicios de una posible unión. Además, se han obtenido resultados positivos que indican la unión de Hth a la región del ADN ribosómico.

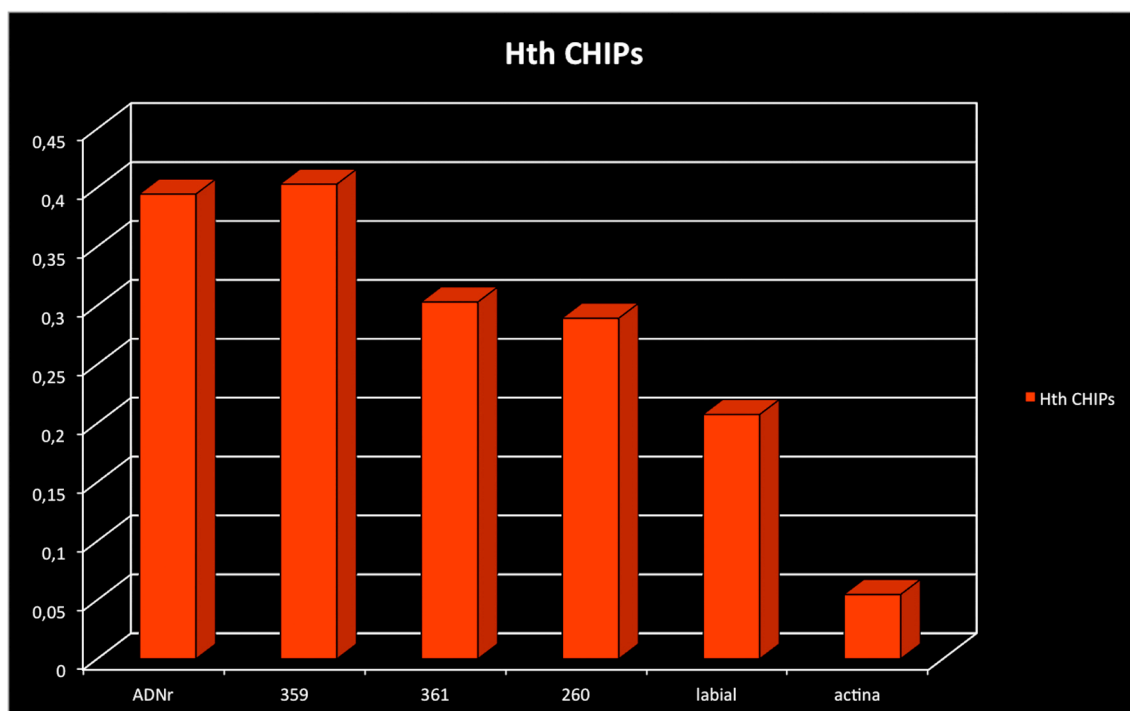


FIGURA R.3.2: Enriquecimiento de la cromatina inmunoprecipitada unida a la proteína Homothorax. La cuantificación está relativizada frente al 1% de la cromatina total empleada durante los ensayos de inmunoprecipitación (1%Input)

Conclusión 11: el factor de transcripción Hth se une *in vivo* a diferentes regiones satélites, así como a la región del ADN ribosómico durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

4.3.3. Cuantificación de la expresión de los ARNs transcritos de secuencias satélites en el embrión de *D. melanogaster*

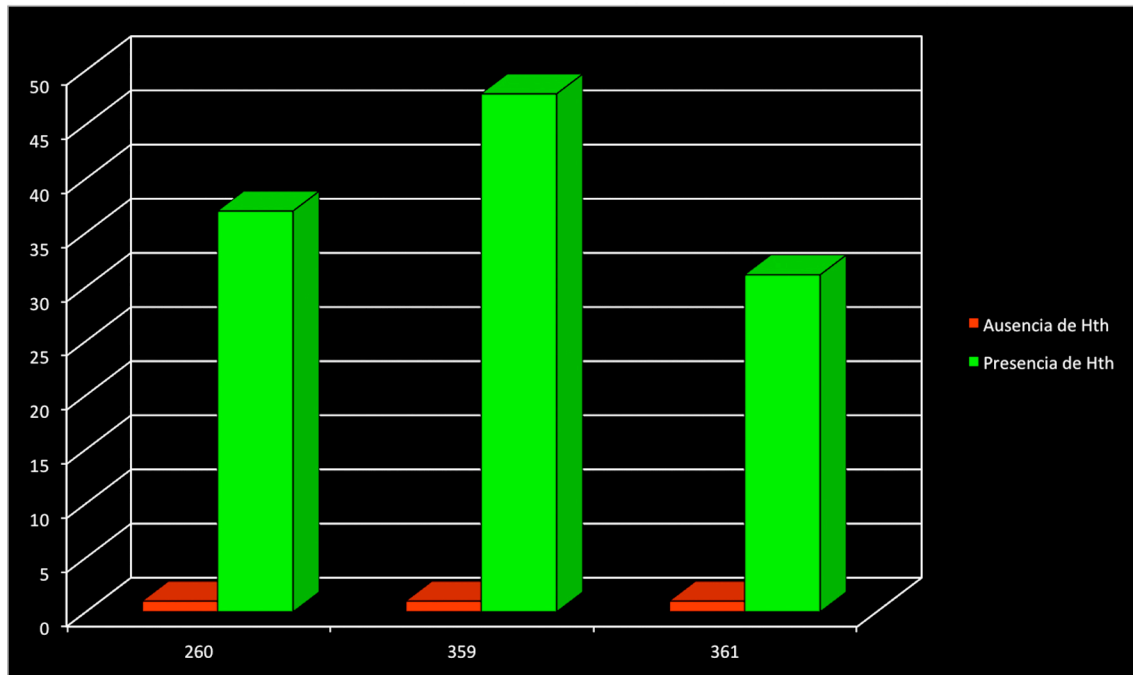
Durante el desarrollo temprano sincitial de *D. melanogaster* se ha comprobado que la presencia del componente materno de *hth* es necesario para la transcripción de

la región centromérica del cromosoma X compuesta por la repetición de ADN satélite de 359 pb. Los transcritos de estas secuencias serían necesarios para el correcto ensamblaje de la heterocromatina centromérica (Salvany, 2009). En este trabajo se ha analizado la transcripción tanto de la región centromérica de ADN satélite repetido de 359 pb como la transcripción de las regiones pericentroméricas de ADN satélite repetido de 260 pb y 361 pb para verificar los datos existentes y ampliarlos al resto de secuencias satélites que son procesadas mediante la maquinaria del ARN interferente. Es importante destacar que en este estudio la cuantificación de la transcripción se ha llevado a cabo en estadios más avanzados del desarrollo embrionario una vez ha tenido lugar la celularización del embrión y se ha iniciado la transcripción de los genes cigóticos. De esta forma es posible dictaminar si la transcripción mediada por el factor de transcripción Hth es relevante a lo largo de todo el desarrollo embrionario.

Se han analizado embriones que portan la mutación en homocigosis del gen *homothorax*, por lo que una vez iniciada la transcripción de los genes cigóticos el desarrollo embrionario se realizará en ausencia del factor de transcripción Hth. La cuantificación relativa de la transcripción de las repeticiones de ADN satélite de 359 pb, 260 pb y 361 pb se ha llevado a cabo mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión de los ARNs transcritos a partir de todas las regiones analizadas se ve drásticamente reducida en ausencia del gen Hth. La transcripción de las regiones analizadas es en todos los casos al menos 30 veces superior en los embriones desarrollados en presencia de Hth (Fig. R3.3).

FIGURA R.3.3: Cuantificación de la transcripción de regiones de ADN satélite durante el desarrollo embrionario en presencia y en ausencia de Hth.



Conclusión 12: la presencia de Hth es necesaria para la correcta transcripción de las secuencias de ADN satélite repetidas de 359 pb, 260 pb y 361 pb a lo largo del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

5-DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran una función del gen *homothorax* en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

Los embriones desarrollados en ausencia de Hth muestran fenotipos similares a los presentados por los embriones que poseen alguna mutación de los genes que participan en el proceso de formación de heterocromatina, como es el caso del factor epigenético de modificación de histonas Su(var)3-9 o el componente de la maquinaria del ARNi Argonauta-2.

Los efectos producidos por la ausencia de Hth durante el desarrollo embrionario pueden ser observados en diversas regiones de la heterocromatina constitutiva. Además de las regiones centroméricas y pericentroméricas, mediante los análisis inmunohistoquímicos, hibridación in situ y los ensayos de accesibilidad de la DNasa I se ha comprobado que la región del ADN ribosómico se encuentra también afectada. Además, los ensayos de accesibilidad de la DNasa I muestran que la heterocromatina del elemento transponible 1360 y el locus de heterocromatina del cromosoma 2, H23, no está correctamente compactada.

La función desempeñada por Hth en el proceso de formación de la heterocromatina no es únicamente relevante durante las etapas preblastodérmicas del desarrollo embrionario temprano. La transcripción cigótica del gen *homothorax* es necesaria para la correcta formación de la heterocromatina. Los embriones mutantes para el gen *homothorax* no presentan una correcta trimetilación de los residuos 9 de lisina de las histonas H3. De igual forma y durante etapas blastodérmicas del desarrollo embrionario, la presencia de Hth es necesaria para la transcripción de todas las regiones de ADN satélite repetido analizadas.

La presencia de Hth durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* es decisiva para la correcta transcripción de las regiones de ADN satélite analizadas. La existencia de un fenotipo de incorrecta formación de la heterocromatina constitutiva asociado a la imposibilidad de una correcta transcripción de las regiones de ADN satélite en ausencia del factor de transcripción Hth, pone de manifiesto la importancia de la intervención de los transcritos de las regiones heterocromáticas, procesados por la maquinaria del ARN interferente, en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario en *D. melanogaster*. De esta forma, se evidencia la existencia de un mecanismo, similar al previamente descrito en levaduras,

de transcripción de regiones de heterocromatina que son procesadas por la maquinaria del ARN interferente e intervienen directamente facultando el proceso de formación de heterocromatina en *D. melanogaster*.

Uno de los principales problemas a los que la epigenética se ha enfrentado es entender de que forma los factores epigenéticos remodeladores de la estructura de la cromatina son capaces de reconocer regiones diana específicas del genoma sobre las que actuar. Este enigma parece haber encontrado respuesta al describirse la función de la maquinaria del ARNi en el proceso de formación de heterocromatina (Moazed, 2001; Kato, 2005; Volpe, 2003; Grewal, 2003; Sugiyama, 2005; Motamedi, 2004; Verdel, 2004; Ekwall, 2004; Grewal, 2007; Bayne, 2010). Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares que se encargan de la elección de las regiones diana genómicas que deben de ser transcritas para dirigir la correcta formación de la heterocromatina.

Los resultados obtenidos en este estudio arrojan nueva luz sobre dicho enigma epigenético. Los datos aquí presentados permiten comenzar a entender el método mediante el cual se cierra el circuito molecular encargado del proceso de formación de la heterocromatina constitutiva.

El proceso de elección e inicio de la transcripción de las regiones prospectivas de heterocromatina podría ser acometido por diferentes factores de transcripción de forma similar al proceso llevado a cabo por el factor de transcripción Hth. Además de la función desempeñada por Hth en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva, descrito por vez primera en el embrión temprano en un contexto preblastodérmico (Salvany, 2009) y estudiado en mayor profundidad en este trabajo, recientemente han sido aportadas nuevas evidencias que demuestran una función de factores de transcripción en el proceso de formación de heterocromatina (Bulut-Karslioglu, 2012; Festenstein, 2012). La implicación general de los factores de transcripción durante la formación de heterocromatina describiría una novedosa función de gran relevancia para estas proteínas capaces de unir ADN. Los factores de transcripción, además de estar llevando a cabo su función clásica descrita como activadores de la expresión génica, serían necesarios para iniciar la transcripción de ARNs no codificantes en las regiones que formarán la heterocromatina constitutiva. De esta manera se iniciaría el proceso de ensamblaje de la heterocromatina y se mantendría la represión transcripcional de las mismas. La acción de estos factores de

transcripción sería esencial y determinante para el correcto mantenimiento de la integridad genómica.

El estudio en *D. melanogaster* del proceso de formación de heterocromatina mediado por la acción del factor de transcripción Hth ha sido recientemente apoyado por la descripción de un mecanismo para la formación de heterocromatina en ratón basado en la acción de factores de transcripción (Bulut-Karslioglu, 2012). La ausencia simultánea de los factores de transcripción Pax3 y Pax9 causa, al igual que lo observado en ausencia de Hth, deslocalización de marcas epigenéticas como la trimetilación del H3K9, defectos en la segregación cromosómica y una transcripción incorrecta de importantes secuencias repetidas de ADN satélite. El análisis realizado a nivel genómico muestra que la metilación del H3K9 aparece enriquecida en las regiones de ADN satélite repetidas únicamente cuando dichas regiones mantienen intactas las secuencias de unión a ADN de PAX y otros factores de transcripción (Bulut-Karslioglu, 2012). Además, el análisis bioinformático realizado en dicho estudio revela que en ratón, todas las regiones de ADN repetido que dependen para su correcta formación de la metiltransferasa Suv39-h (Su(var)3-9 en *D. melanogaster*) muestran la presencia de sitios de unión a ADN de factores de transcripción (Bulut-Karslioglu, 2012). De esta forma se definiría un modelo general en el cual la reiterada disposición de secuencias de unión a factores de transcripción en las regiones de ADN satélite constituiría un mecanismo intrínseco para la formación de la heterocromatina constitutiva.

Los resultados de este trabajo demuestran que a lo largo de distintas regiones de ADN satélite existen multitud de secuencias de unión a ADN que el factor de transcripción Hth es capaz de reconocer. Hth se une a dichas secuencias promoviendo la transcripción de estas regiones de heterocromatina. Los productos originados por la transcripción iniciada por Hth podrían ser procesados mediante la maquinaria del ARNi, dando lugar a siRNAs que guiarían a los factores epigenéticos de remodelación de cromatina, como la proteína Su(var)3-9, a las regiones diana inicialmente transcritas por la acción de Hth. De esta forma podría ocurrir correctamente el proceso de formación de heterocromatina, resolviéndose además los problemas de elección e inicio de transcripción de regiones diana y el proceso de guía y acoplamiento de los factores epigenéticos, que participan en la modificación de las histonas, a las regiones diana del genoma.

Es posible que los factores de transcripción Hth y Exd estén participando de forma conjunta durante el proceso de formación de heterocromatina. Según ha sido sugerido, durante el desarrollo embrionario preblastodérmico, el factor de transcripción Hth, presumiblemente junto con Exd, facilita la transcripción de las regiones de heterocromatina centromérica llevada a cabo por la ARN polimerasa II (Salvany, 2009). En este trabajo se han identificado, mediante el análisis *in silico* de las secuencias de bases nucleotídicas, la presencia de posibles lugares de unión al ADN del factor de transcripción Exd en distintas regiones de ADN satélite. Es posible sugerir que al igual que Hth, Exd sería capaz de unirse a dichas regiones y promover su transcripción. La presencia de secuencias de unión conjuntas para el dímero formado por Hth-Exd en las tres regiones analizadas sugiere la posibilidad de la acción conjunta de ambas proteínas en el proceso de transcripción de dichas secuencias y el correcto ensamblaje de la heterocromatina. La ausencia de Exd genera un fenotipo similar al observado en ausencia de Hth (salvany, 2009), sin embargo a día de hoy se desconoce de que forma la ausencia de Exd afecta en detalle a la ruta de modificación de histonas y si su ausencia, al igual que la ausencia de Hth, conlleva la incorrecta trimetilación del H3K9 y la acumulación de residuos H3K9 dimetilados.

Anteriormente ha sido demostrado que tanto Hth como Exd colocan con la ARN polimerasa II en embriones preblastodérmicos. Y han sido observados ARNs en transcripción que colocan con la presencia de Hth, Exd y la ARN polimerasa II (Salvany, 2009). En este trabajo se demuestra que la ausencia de Hth es determinante durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* para la transcripción de las repeticiones de 359 pb, 260 pb y 361 pb de ADN satélite. En ausencia de Hth la transcripción de dichas regiones se ve drásticamente reducida, mostrando niveles de expresión al menos 30 veces inferiores a los existentes en presencia de Hth.

Los datos existentes y presentados sobre la transcripción de regiones de ADN satélite mediada por Hth sugieren que estas regiones no codificantes comienzan a transcribirse antes que los genes cigóticos codificantes. Pese a no haberse alcanzado el blastodermo celular e iniciado la transcripción cigótica, en el embrión temprano tiene lugar la transcripción de secuencias de ADN repetido necesaria para la correcta formación y ensamblaje de la heterocromatina constitutiva. Según el modelo aportado en este trabajo, el factor de transcripción Hth se uniría a regiones prospectivas de heterocromatina mediante el reconocimiento de secuencias específicas de unión dispuestas en las mismas. De esta forma tendría lugar la elección de secuencias dianas sobre las cuales actuarían los factores epigenéticos. Al unirse a estas regiones, Hth

desencadenaría y mediaría el proceso de transcripción de las mismas originándose, de este modo, los transcritos que podrían mediar la trimetilación del H3K9.

La ruta de modificación de histonas en ausencia de Hth ha sido caracterizada y ha sido posible observar que los procesos que tienen lugar hasta la trimetilación del H3K9 ocurren con normalidad. Si bien la trimetilación del H3K9 no acontece correctamente, la dimetilación del H3K9 durante el desarrollo embrionario no se ve impedida y se observa una acumulación de esta marca epigenética en los núcleos del embrión en desarrollo. En este trabajo se propone que dicha acumulación podría deberse a la incapacidad de llevar a cabo correctamente, en ausencia de Hth, la trimetilación de los residuos 9 de lisina de la histona H3. De esta forma, los residuos de H3K9 que deberían ser trimetilados permanecen dimetilados acumulándose en los núcleos. El hecho de que la dimetilación y no la trimetilación del H3K9 pueda llevarse a cabo correctamente añade complejidad al proceso descrito para la formación de la heterocromatina y la ruta de modificación de histonas, introduciendo un paso limitante situado entre la dimetilación y la trimetilación del H3K9. El mecanismo molecular mediante el cual la ausencia de Hth afecta al proceso de trimetilación del H3K9 y no a la dimetilación de dicho residuo es desconocido. Sin embargo, es posible que el mantenimiento de los niveles en la transcripción de las regiones de heterocromatina sea determinante para el proceso de trimetilación. Esto implicaría que, en ausencia de Hth, la drástica reducción de los niveles de transcripción de las regiones de heterocromatina sea suficiente para impedir la última metilación que debe sufrir el H3K9. Es decir, debido a la complejidad y posible redundancia del proceso de transcripción de las regiones de heterocromatina mediado por factores de transcripción, como podría ser el caso de Exd, los niveles basales de transcritos producidos serían suficientes para guiar a los factores epigenéticos, concretamente a la proteína Su(var)3-9, para iniciar la metilación y dimetilación del H3K9 pero no para guiar y concluir el proceso de la trimetilación.

De forma alguna, la incorrecta trimetilación del H3K9, pese a la presencia de residuos H3K9 dimetilados, resulta crítica para la correcta formación de la heterocromatina durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. La acumulación de residuos dimetilados de H3K9 no suple la carencia y deslocalización de la marca epigenética del H3K9 trimetilado. Si bien una posible redundancia entre los factores epigenéticos y las proteínas que participan en el proceso de formación de la heterocromatina, así como una ruta de modificación de histonas que tiene lugar de forma correcta hasta la última etapa de metilación del H3K9 garantiza y compensa en

cierta medida la formación de heterocromatina durante el desarrollo embrionario, los resultados aquí expuestos evidencian que dicha formación de heterocromatina no se completa adecuadamente.

Las diferencias del significado funcional entre los distintos estados de metilación del H3K9, pudiéndose encontrar estos residuos de lisina monometilados, dimetilados y trimetilados, no se conoce adecuadamente. Existen algunos estudios al respecto realizados en células madre embrionarias de ratón (Lachner, 2003; Peters, 2003; Rice, 2003). En ratón existen tres metiltransferasas implicadas en la metilación del H3K9, las proteínas homólogas a Su(var)3-9, denominadas Suv39h1 y Suv39h2, y la metiltransferasa G9a (Peters, 2003; Rice, 2003). Las diferencias entre la dimetilación y la trimetilación del H3K9 podrían estar relacionadas con la adquisición de una inhibición transcripcional más robusta (Lachner, 2003). Respecto a la formación de la heterocromatina constitutiva, ha sido descrito que la heterocromatina pericentromérica se encuentra enriquecida en residuos trimetilados de H3K9 en ratón (Lachner, 2003; Peters, 2003; Rice, 2003). En ausencia de las proteínas Suv39h esta marca epigenética se pierde, pero a pesar de ello es observable dimetilación del H3K9, independiente de la acción de Suv39h, en la heterocromatina centromérica (Lachner, 2003; Peters, 2003). Las proteínas Suv39h son las enzimas encargadas de la trimetilación del H3K9 y las encargadas de convertir estados intermedios de metilación (monometilación y dimetilación) en el estado final trimetilado aparentemente más estable. De esta forma se aumentaría y adquiriría la robustez necesaria para la correcta formación de la heterocromatina constitutiva (Lachner, 2003). Se observó que en ausencia de las metiltransferasas Suv39h, las células tratan de compensar la falta de H3K9 trimetilado induciéndose la trimetilación del H3K27 (Peters, 2003), esto es una muestra evidente de la plasticidad que presentan los sistemas epigenéticos de modificación de histonas y la naturaleza dinámica del proceso de metilación de los residuos de lisina de las histonas. Los estudios de la metilación en células madre embrionarias de ratón describen que, mediante el uso de anticuerpos altamente específicos, la monometilación y la dimetilación del H3K9 se localiza específicamente en dominios silenciados de eucromatina y heterocromatina facultativa, mientras que la trimetilación del H3K9 se encuentra enriquecida en la heterocromatina centromérica y pericentromérica (Rice, 2003). Según ha sido demostrado, las proteínas Suv39h1 y Suv39h2 dirigen la trimetilación del H3K9 específicamente en la heterocromatina constitutiva, mientras que la metiltransferasa G9a sería responsable de toda la dimetilación de H3K9 detectable y una cantidad significativa de la monometilación de la eucromatina silenciada (Rice, 2003). De esta forma se concluye que, en células

embrionarias de ratón, los diferentes estados metilados de H3K9 son producidos por metiltransferasas específicas para marcar diferentes dominios de heterocromatina (Rice, 2003). Del mismo modo se especula, aunque no ha sido experimentalmente demostrado, que el aumento en los niveles de metilación del H3K9 conlleva un aumento en los niveles de silenciamiento y de la estabilización de la heterocromatina.

Una de las principales características de la metilación del H3K9 es que crea lugares de unión para proteínas accesorias de la heterocromatina como Hp1. Ha sido descrito que esta proteína es capaz de unir con comparable afinidad residuos dimetilados y trimetilados de H3K9 (Jacobs, 2001; Nielsen, 2002). Una de las incógnitas que se mantiene es el motivo por el cual la proteína Hp1 se pierde de la heterocromatina constitutiva en ausencia de Suv39h, pese a que en las regiones centroméricas existen residuos dimetilados de H3K9 (Peters, 2003). Ha sido argumentado que posiblemente la trimetilación del H3K9 presente una señal más robusta para la unión de Hp1 *in vivo* y que la trimetilación del H3K9 evite modificaciones adicionales que pudiesen ocurrir, con mayor facilidad si los residuos H3K9 presentaran únicamente dimetilación, y que imposibilitaran la correcta unión de Hp1 y la formación de la heterocromatina (Peters, 2003).

La alteración del proceso de trimetilación del H3K9 debería afectar a las etapas sucesivas de la ruta de modificación de histonas. Ha sido descrito que en ausencia del factor de transcripción Hth, la localización de la proteína HP1, asociada a las regiones de heterocromatina centromérica y telomérica, se encuentra alterada. El marcaje inmunohistoquímico de HP1 en embriones desarrollados en ausencia del componente materno del gen *hth* es difuso y en ocasiones puede observarse con mayor intensidad al ser dicha proteína incapaz de asociarse correctamente a regiones concretas de heterocromatina nuclear (Salvany, 2009). Un fenotipo similar de deslocalización de HP1 ha sido observado en ausencia de la proteína de la maquinaria del ARNi Ago-2 (Deshpande, 2005).

Este trabajo ha puesto en evidencia que en ausencia del factor de transcripción Hth, la trimetilación temprana e inicial de los residuos H3K9 no tiene lugar en el momento apropiado del desarrollo. Alcanzado el ciclo de división 14, no es posible la identificación de esta marca epigenética en los núcleos que forman una monocapa dispuestos en la periferia del embrión. Pese a la recuperación parcial de dicha marca epigenética en fases más tardías del desarrollo embrionario, los embriones desarrollados en ausencia de Hth y del componente materno de *hth* no muestran unos

niveles adecuados de trimetilación de los residuos de H3K9 ni una localización correcta de dicha marca epigenética. En ausencia de Hth las regiones de heterocromatina analizadas no quedan correctamente establecidas. La recuperación parcial de la trimetilación del H3K9 bien podría deberse a la redundancia funcional de ciertas proteínas y factores de transcripción, como podría ser el caso de Exd, durante el proceso de formación de la heterocromatina. *Homothorax* debe de ocupar un lugar fundamental en una red coordinada de genes con funciones redundantes encargadas del proceso de metilación del H3K9 capaz de rescatar parcialmente su ausencia.

La heterocromatina puede inhibir la expresión génica de las regiones de eucromatina situadas en dominios adyacentes. Este silenciamiento por efecto de posición (PEV) ha sido estudiado en gran detalle en *D. melanogaster*. Más de 500 mutaciones dominantes responsables de alterar dicho proceso de silenciamiento han sido aisladas y catalogadas (Schotta, 2003). Todas estas mutaciones han de corresponderse con genes que de alguna forma se encuentran implicados en el proceso de formación de heterocromatina. Aquellos genes cuya mutación acompañe la supresión o el aumento del PEV han de ser genes relevantes para la correcta formación de la heterocromatina, ya que al modificarse la formación de la heterocromatina el silenciamiento por efecto de posición se ve impedido.

De todos los genes supresores del PEV catalogados, solo se conoce en cierto grado la implicación molecular en el proceso de formación de heterocromatina de unos pocos. La proteína Su(var)3-9 es la metiltransferasa encargada de la metilación del H3K9. Su(var)2-5 se corresponde con la proteína HP1. Su(var)4-20 es la metiltransferasa responsable de la metilación del H4K20. Ha sido descrito que Su(var)3-7 es una proteína capaz de unir ADN, ya que presenta un dedo de zinc, e interacciona con HP1 (Cléard, 1997; Delattre, 2000; Jaquet, 2002; Jaquet, 2006). Además de las proteínas previamente descritas, ha sido demostrada una asociación física *in vivo* y una interacción funcional entre Su(var)3-9 y la proteína desacetilasa HDAC1 (Czernin, 2001). El proceso de formación de heterocromatina presenta una gran complejidad y a día de hoy queda mucho que desentrañar sobre el mecanismo molecular que lo dirige. La existencia de un elevado número de genes interviniendo en este proceso de los cuales se desconoce su función molecular refleja dicha complejidad y apoya la existencia de un proceso en red capaz de generar funciones redundantes entre las diversas proteínas que interactúan durante la formación de la heterocromatina.

Los datos obtenidos en este estudio presentan implicaciones clínicas. Los resultados aquí expuestos describen la función de un factor de transcripción, Hth, revelando su función en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva. La correcta formación de la heterocromatina constitutiva es de vital relevancia para salvaguardar la integridad y la estabilidad genómica. La incorrecta formación de la heterocromatina centromérica produce errores en el proceso de división celular que pueden generar segregaciones cromosómicas defectivas que pueden asociarse a la aparición de aneuploidias asociables a la formación de procesos cancerosos. Las mutaciones de los genes ortólogos de *homothorax* en vertebrados superiores, *meis1* y *prep1*, se encuentran relacionadas con la aparición diversos tipos de procesos oncogénicos. *Meis1* es un oncogen mientras que *prep1* actuaría como un gen supresor de tumores. Ha sido descrita la importancia del gen *prep1* salvaguardando la estabilidad genómica (Iotti, 2011) y la desregularización de la transcripción de secuencias repetidas de ADN satélite ha sido descrita en procesos cancerosos epiteliales y cáncer de páncreas (Ting, 2011). Este trabajo puede ayudar a comprender el papel desempeñado por dichos genes en la aparición de cáncer y puede servir para desvelar la base del mecanismo de acción de otros factores de transcripción cuyas implicaciones durante el proceso y mantenimiento de la heterocromatina constitutiva puedan ser descubiertas.

6-CONCLUSIONES

1. Los embriones desarrollados en ausencia de Hth se caracterizan por la presencia de fragmentos de ADN dispersos en el citosol sincitial embrionario. Además, en ausencia de Homothorax las roturas y el daño en el ADN nuclear se ven incrementados.
2. Los núcleos de los embriones desarrollados en ausencia de Hth muestran desorganización nucleolar y descondensación del ADN ribosómico. Este fenotipo es además similar y comparable al que presentan las células que poseen alterada alguna etapa del proceso de formación de heterocromatina.
3. En ausencia del factor de transcripción Hth todas las regiones de heterocromatina constitutiva analizadas no se forman correctamente. El proceso de formación de heterocromatina se encuentra afectado y las regiones de heterocromatina son incapaces de adquirir la estructura altamente compactada que las caracteriza. El factor de transcripción Hth es fundamental en el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.
4. El proceso de reemplazo de la histona H2A por su variante la histona H2Av sucede correctamente en embriones desarrollados en ausencia de Hth.
5. El proceso de acetilación del H4K12 sucede correctamente en embriones desarrollados en ausencia de Hth. Es destacable que esta modificación epigenética se asocia a regiones de heterocromatina únicamente durante el desarrollo embrionario sincitial temprano.
6. El proceso de trimetilación del H3K9 se ve alterado en ausencia del factor de transcripción Hth. Se observa una patente reducción en los niveles de trimetilación del H3K9. Esta marca epigenética no es apreciable en un alto número de núcleos y se observa difusa y no se asocia correctamente con las regiones de heterocromatina. La presencia de Hth es crítica durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* para la correcta trimetilación del H3K9.

7. La presencia del factor de transcripción Hth durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* no es necesaria para que la dimetilación del H3K9 pueda llevarse a cabo. En ausencia de Hth, la dimetilación del H3K9 parece acumularse en los núcleos del embrión en desarrollo. Es posible que esta acumulación de residuos H3K9 dimetilados se deba a la imposibilidad de llevar a cabo correctamente la trimetilación de los mismos.

8. la presencia de Hth durante el desarrollo temprano sincitial es necesaria e imprescindible para desencadenar la trimetilación temprana del H3K9 de forma coordinada con la organización temporal establecida.

9. La trimetilación del H3K9 es parcialmente recuperada a lo largo del desarrollo embrionario por una vía independiente de la función del gen *hth*. Los embriones desarrollados en ausencia total de Hth acaban mostrando trimetilación de los residuos H3K9. Sin embargo, los niveles de la trimetilación del H3K9 en estos embriones se ve reducida al menos en un 50%, no es apreciable en todos los núcleos y aparece difusa mostrando una asociación defectiva con las regiones de heterocromatina.

10. Existen secuencias de unión a ADN reconocidas por los factores de transcripción Hth y Exd, así como de los dímeros Hth-Exd en las repeticiones de ADN satélite de la familia 1.688 de 260 pb, 359 pb y 361 pb.

11. El factor de transcripción Hth se une *in vivo* a diferentes regiones satélites, así como a la región del ADN ribosómico durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

12. La presencia de Hth es necesaria para la correcta transcripción de las secuencias de ADN satélite repetidas de 359 pb, 260 pb y 361 pb a lo largo del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*.

13. Este trabajo aporta nuevas evidencias que apoyan un modelo para el proceso de formación de la heterocromatina constitutiva mediado y basado en la acción de los factores de transcripción. Según dicho modelo, diversos factores de transcripción seleccionarían las regiones diana del genoma y desencadenarían su transcripción. Los productos de esta transcripción servirían de molde y serían procesados por la maquinaria del ARNi produciendo siRNAs y piRNAs. Finalmente, estos guiarían a los múltiples factores epigenéticos de modificación de histonas a las regiones diana del genoma.

7-APÉNDICE METODOLÓGICO

-Selección de embriones mutantes y obtención de clones en la línea germinal (Figura M.1)

Durante el estudio realizado hemos empleado embriones de la línea *yellow-white* de *D. melanogaster* como muestra de condición silvestre. Para analizar el desarrollo de embriones mutantes del gen *homothorax* hemos empleado la línea de deficiencia DF(3R)*hth* de Exelisis (6158).

El análisis de embriones mutantes se llevó a cabo en homocigosis. La elección de embriones mutantes homocigóticos se realizó mediante su selección en lupa de fluorescencia. En homocigosis, los embriones *hth*^{DF}/TM3,GFP pierden la fluorescencia de la proteína GFP y pueden ser de esta forma identificados.

Para analizar estadios tempranos del desarrollo embrionario de *D. melanogaster* en ausencia de Hth, se realizaron clones en la línea germinal para eliminar el componente materno del gen *homothorax* cedido por la madre al embrión. La generación de los clones de línea germinal se llevó a cabo seleccionando hembras vírgenes del genotipo P(ovoFLP.R)M1B; FRT82B*hth*^{DF}/TM6 y cruzándolas con machos del genotipo FRT82B ovo^{D1}/βtub85De/TM3,Sb. De la descendencia de dicho cruce se seleccionaron aquellas hembras vírgenes que fueran del genotipo P(ovoFLP.R)M1B; FRT82B*hth*^{DF}/FRT82B ovo^{D1} y se cruzaron con machos del genotipo *hth*^{DF}/TM3,GFP. Los embriones depositados durante este segundo cruce carecen del componente materno del gen *homothorax* y además, una vez comienza la transcripción cigótica pueden ser seleccionados en la lupa de fluorescencia para finalmente analizar embriones que se hayan desarrollado en una ausencia total de Hth. Estos embriones carecerán tanto del componente materno como del componente cigótico.

-Obtención y fijación de embriones de *Drosophila melanogaster*

Los embriones fueron recogidos de placas de puestas y a continuación tratados durante 2 minutos con lejía para eliminar el corion. Una vez eliminado el corion, los embriones fueron lavados con abundante agua. Los embriones pueden ser congelados a -80°C en este punto.

Para realizar los ensayos de inmunohistoquímica, los embriones fueron previamente fijados. La fijación de los embriones ha sido realizada en agitación

The diagram illustrates the genetic strategy for generating a homozygous mutant germ-line clone in *Drosophila*. It shows the following steps:

- Parental Cross:** A male fly with a $P\{ovo^D\}$ driver and a balancer chromosome is crossed with a female fly carrying a maternal-effect mutation m and a balancer chromosome.
- Offspring:** The resulting female offspring carries one $P\{ovo^D\}$ driver and one m mutation on homologous chromosomes.
- Flippin:** The offspring is crossed with a Flp recombining enzyme.
- Outcomes:**
 - Homozygous mutant germ-line clone:** Flippin recombines the driver and the mutation, resulting in a homozygous m/m state in the germ line.
 - Twin-spot clone DEAD:** Flippin recombines the driver and the mutation, resulting in a homozygous $P\{ovo^D\}/P\{ovo^D\}$ state, which is lethal.
 - Non-recombinant DEAD:** No recombination occurs, resulting in a non-recombinant state, which is also lethal.

Figura M.1. Método de obtención de clones en la línea germinal en *Drosophila melanogaster*. (St Johnston, 2002).

-Análisis inmunohistoquímicos

Para las tinciones o marcajes inmunohistoquímicos se ha partido de embriones fijados y conservados en metanol. El primer paso realizado fue la rehidratación de los embriones añadiendo a partes iguales metanol y PBT (PBS; 0,1% Tween) y posteriormente únicamente PBT. A continuación los embriones fueron bloqueados en BSA al 10% durante un mínimo de 30 minutos para evitar marcaje inmunohistoquímico inespecífico. Posteriormente los embriones fueron incubados con el anticuerpo primario diluido en PBT O/N a 4°C. Terminada la incubación, el anticuerpo primario fue lavado con PBT y las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario diluido en PBT durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalizada la incubación del anticuerpo secundario, se realizó el lavado de la muestra empleando PBT y durante el proceso de lavado se llevo a cabo la tinción del ADN mediante el uso de TOPRO3 diluido en PBT (1:1000) durante 10 minutos. Tras el lavado de los embriones, las muestras fueron montadas en Vectashield (Vector Laboratories) y observadas al microscopio confocal (Leica).

Los anticuerpos y sus correspondientes diluciones empleadas fueron los siguientes:

- α -H2Av, generado en conejo; dilución 1:1.000 (Robert L. Glaser)
- α -H2AvP, generado en conejo; dilución 1:400 (Rockland)
- α -H4K12 acetilado, generado en conejo; dilución 1:1.000 (Active Motif)
- α -H3K9 trimetilado, generado en conejo; dilución 1:400 (Millipore)
- α -H3K9 dimetilado, generado en conejo; dilución 1:400 (Cell Signaling Technology)
- α -GFP, generado en ratón; dilución 1:200
- α -Fibrilarina, generado en ratón; dilución 1:200 (Novus Biologicals)

-Obtención de la sonda de ADNr

El fragmento de ADNr fue amplificado a partir de ADN genómico mediante PCR empleando el kit *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) según las especificaciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados para llevar a cabo la amplificación fueron:

-ADNr_{fw}: 5'-GGC TAA AAC CAA GCG ATC GC-3'

-ADNr_{rv}: 5'-TTT TCG TCA CTA CCT CCC CG-3'

El fragmento de ADN_r amplificado fue aislado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y la extracción del ADN fue llevada a cabo empleando *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN purificado fue medida mediante un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y la preparación de la sonda se realizó a partir de 300ng del mismo, desnaturalizado durante 10 minutos a 95°C. El marcaje de la sonda de ADN se llevó a cabo mediante el uso de *bio-labeling kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda fue limpiada mediante filtración en *sephadex* en presencia de 1μl de ARNt.

-Doble marcaje inmunohistoquímico de fibrilarina e hibridación fluorescente *In Situ* (FISH) de ADN_r

Se ha llevado a cabo según se encuentra descrito (Peng, 2007; Dernburg, 1996). El marcaje de inmunofluorescencia se realizó de forma previa a la hibridación *in situ*. Para conseguir que la sonda de ADN_r penetrara correctamente en los núcleos embrionarios, la sonda fue desnaturalizada junto con los embriones a 91°C durante 2 minutos (Dernburg, 1996).

Para el revelado de la sonda de ADN_r las muestras fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo α-DIG (digoxigenina) generado en cabra (*goat*) (dilución 1:200). Tras el lavado (15 minutos x3) se realizó la incubación de las muestras con anticuerpo α-Goat biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente (dilución 1:200). Las muestras fueron lavadas de nuevo y tratadas durante 45 minutos con *AB Complex* (Vectastain, Vector Laboratories). Finalmente, las muestras fueron incubadas durante 10 minutos con tiramida-FITC.

La tinción del ADN mediante TOPRO y el montaje de las muestras fueron realizadas como anteriormente se ha especificado en el apartado de marcajes inmunohistoquímicos.

-Ensayo de accesibilidad de DNAsa

El ensayo de accesibilidad de cromatina (Zhang, 2008) ha sido realizado empleando 30µl de embriones descorionados y homogenizados. Los embriones fueron homogenizados en hielo y añadidos a 1ml de *Buffer A* (15mM Tris-HCl pH 7,4; 60mM KCl; 15mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; inhibidor de proteasas (Roche) enfriado en hielo. Se realizó una primera centrifugación (400g, 1 minuto) y el sobrenadante volvió a ser centrifugado (1.100g, 10 minutos). Seguidamente el sobrenadante fue eliminado y las células resuspendidas en 60µl de *Buffer B* (10mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM MgCl₂; 10mM NaCl; 25% glicerol; inhibidor de proteasas (Roche). En este punto la preparación puede ser congelada a -80°C. A continuación fue nuevamente añadido 1ml de *buffer A* a las muestras y para conseguir la permeabilización de las células se añadió NP-40 hasta una concentración final del 0,1%. La incubación para facilitar la permeabilización de las células fue realizada durante 5 minutos en hielo. Las células fueron recuperadas mediante centrifugación a 4°C (1.500g, 8 minutos).

Para llevar a cabo la digestión enzimática empleando DNAsa, las células fueron resuspendidas en 500µl de DNAsa I *Buffer* (New England BioLabs) y divididas en 2 muestras de 250µl, una de las cuales fue tratada con DNAsa I y la otra sirvió como control de muestra sin digerir. El tratamiento con DNAsa I (New England BioLabs) fue llevado a cabo a 37°C durante 15 minutos a una concentración de 100U/ml (fueron añadidas 25U de DNAsa I). La reacción de digestión enzimática fue parada añadiendo EDTA hasta una concentración molar de 25mM. Las células fueron lisadas empleando 45µl de *buffer* de lisis 6xSDS (6% SDS; 300mM Tris-HCl pH 8; 120mM EDTA). Seguidamente se trataron las muestras O/N a 37°C en agitación con proteinasa K a una concentración de 0,5mg/ml. El ADN fue purificado mediante fenol/cloroformo. Se realizó la extracción de ADN y el lavado de sales de las muestras empleando *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente el ADN fue diluido en *buffer TE* (10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA) a una concentración de 20ng/µl. La medición y ajuste de la concentración del ADN de las muestras se llevó a cabo mediante el uso de un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

-Extracción de histonas

La obtención de histonas ha sido realizada mediante el protocolo de extracción ácida de histonas (Shechter, 2007; Rodríguez-Collazo, 2009). Para ello se ha partido de embriones descorionados y congelados a -80°C . Los embriones han sido disgregados y resuspendidos en 1ml de *buffer* de lisis hipotónico enfriado en hielo (10mM Tris-Cl pH 8.0; 1mM KCl; 1.5mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; inhibidor de proteasas (Roche), e incubados durante 30 minutos a 4°C en una noria. El resto del proceso de extracción ha sido realizado a 4°C . Los núcleos han sido recuperados mediante centrifugación (10.000g, 10 minutos) a 4°C y resuspendidos en 400 μl de HCl 0.2N. La incubación que permite la disolución de las histonas en el ácido ha sido realizada a 4°C O/N en noria. La eliminación y separación de los desechos nucleares del sobrenadante que contiene las histonas ha sido realizada mediante centrifugación a 4°C (16.000g, 10 minutos). La precipitación de las histonas ha sido realizada añadiendo gota a gota 132 μl de TCA y mezclando por inversión (concentración final de TCA de 33%), e incubando un mínimo de 30 minutos en hielo. Las histonas han sido recuperadas mediante centrifugación a 4°C (16.000g, 10 minutos) y lavadas con acetona enfriada en hielo. Este proceso de lavado fue llevado a cabo 2 veces. El sobrenadante fue eliminado y las histonas fueron secadas al aire a temperatura ambiente 20 minutos. Finalmente las histonas fueron resuspendidas en H_2O mili-Q y su concentración fue medida y calculada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

-Western blot

30 μg de histonas purificadas fueron separadas mediante electroforesis en un gel SDS/PAGE al 15%. Una vez llevada a cabo la separación, las histonas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Tanto la membrana de nitrocelulosa como el gel fueron equilibrados durante 10 minutos en *buffer* de transferencia (750ml contienen: 525ml de H_2O ; 75ml Tris Glicina 10x; 150ml metanol). La transferencia se llevó a cabo a 4°C en *buffer* de transferencia enfriado durante 1 hora a 100V. La correcta transferencia de las histonas del gel a la membrana fue comprobada mediante tinción de Ponceau. A continuación la membrana fue lavada con PBT (PBS; Tween 0,1%) y bloqueada durante 1 hora en *buffer* de bloqueo (BSA 1%; PBS; Tween 0,1%). Finalizado el bloqueo de la membrana, se realizó la incubación de la membrana en agitación con el anticuerpo primario diluido en *buffer* de bloqueo a 4°C O/N en una

bolsa de plástico sellada. Los anticuerpos usados y su concentración se detalla a continuación:

- α -H3K9 trimetilado, generado en conejo; dilución 1:4.000 (Millipore)
- α -H3K9 dimetilado, generado en conejo; dilución 1:4.000 (Cell Signaling Tech.)
- α -H3, generado en conejo; dilución 1:4.000

Realizada la incubación de la membrana con el anticuerpo primario se continuó con el lavado de la membrana con PBT. Se realizaron 4 lavados sucesivos de 5 minutos en agitación. Finalmente la membrana fue incubada 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo secundario diluido en *buffer* de bloqueo. Se empleó anticuerpo secundarios α -*Rabbit* (Li-cor Bioscience) (dilución 1:10.000). La adquisición de las imágenes se realizó empleando un equipo *Odyssey* (Li-cor Bioscience).

Como control de carga se ha empleado la histona H3. Se realizó un proceso de *stripping* de las membranas entre ambos análisis de *western blot* (1hora a temperatura ambiente; Tris-HCl pH6,7 62,5mM, SDS 2%, β -mercaptoetanol 100mM).

Las bandas inmunoreactivas de los ensayos de *western blot* se cuantificaron densitométricamente con el programa informático Image Quant (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA).

-Extracción y digestión de ADN genómico

Los embriones fueron homogenizados en 100 μ l de solución de lisis (0,1M Tris-HCl pH 9; 0,1M EDTA; 1% SDS) e incubados a 70°C durante 30 minutos. A continuación fueron añadidos 14 μ l de acetato potásico 8M y se dejó incubar la muestra 30 minutos en hielo. Seguidamente se llevó a cabo una centrifugación a 4°C (15.000 rpm, 15 minutos) y el sobrenadante fue recogido. Para precipitar el ADN se añadieron 0.5 volúmenes de isopropanol y se incubó la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. El ADN fue recogido mediante centrifugación y resuspendido en 50 μ l de *buffer* TE (10mM Tris-HCl pH 8; 1mM EDTA). La muestra del ADN obtenido fue sometida a una extracción de fenol-cloroformo. Finalmente se llevo la muestra al 10% de acetato sódico 3M y para precipitar el ADN se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100%. La precipitación se llevo a cabo a -20°C durante un mínimo de 20

minutos. El ADN obtenido se recogió mediante centrifugación y fue posteriormente lavado con etanol al 70% antes de ser resuspendido en *buffer* TE.

Para la obtención de una recta patrón de concentración de ADN cuantificable mediante qPCR, se digirieron 3µg de ADN genómico (2µl de ADN 1,5µg/µl) empleando 0,5µl de la enzima de restricción Hind III (Roche) a 37°C durante 1 hora. La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20µl a una concentración final de *Buffer B* (Roche) de restricción del 10%. La concentración del ADN digerido fue medida y ajustada a 10⁻⁸g/µl usando un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Se prepararon muestras de 10⁻⁹g/µl, 10⁻¹⁰g/µl y 10⁻¹¹g/µl mediante dilución seriada de la muestra inicial.

-Análisis *in silico* de secuencias de unión a los factores de transcripción Hth y Exd

Para obtener la secuencia genómica de las regiones centroméricas y pericentroméricas de ADN satélite repetido de 260 pb, 359 pb y 361 pb se empleó la herramienta de *BLAST* disponible en la *web* flybase.org.

La búsqueda se realizó mediante la identificación de la secuencia de las parejas de oligonucleótidos, correspondientes a cada región de ADN satélite, en el genoma de *D. melanogaster*.

260*fw*: 5'-TGGAAATTTAATTACGAGCT-3'

260*rv*: 5'-ATGAAACTGTGTTCAACAAT-3'

359*fw*: 5'-GTTTTGAGCAGCTAATTACC-3'

359*rv*: 5'-TATTCTTACATCTATGTGACC-3'

361*fw*: 5'-TGAGCTCGTAATAAAATTTCC-3'

361*rv*: 5'-TCAACGATGTATGACATTCC-3'

Se seleccionaron secuencias delimitadas por cada pareja de oligonucleótidos que contuviesen al menos una vez el número de pares de bases correspondientes a cada repetición de ADN satélite y presentes en los cromosomas adecuados (359, cromosoma X; 260, cromosoma 2L; 361, cromosoma 3L). En cada secuencia se buscaron posibles lugares de unión a los factores de transcripción Hth y Exd cuyas secuencias han sido descritas (Jaw, 2000; Fujioka, 2012; TESS Database).

-Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP)

Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se llevaron a cabo partiendo del ADN obtenido de 0,3g de embriones *yellow-white*, siguiendo un protocolo previamente descrito (Negre, 2006).

Los embriones homogenizados fueron sonicados 5 veces (pulsos continuos de 10 segundos a una amplitud de 7 micrones) en un sonicador MSE Soniprep 150 con la micropunta a 4°C y un enfriamiento en hielo de 30 segundos entre cada pulso. Para comprobar el tamaño de los fragmentos obtenidos el ADN fue corrido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando un enriquecimiento de fragmentos situados entre las 200pb y las 700pb.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo empleando anticuerpo α -Hth generado en conejo (dilución 1:25) (Aldaz, 2005) y anticuerpo α -Hth generado en cobaya (dilución 1:25) (Aldaz, 2005). El ADN inmunoprecipitado fue cuantificado mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

La cuantificación absoluta de los resultados ha sido presentada en base al enriquecimiento de ADN normalizado con la cantidad total de cromatina inmunoprecipitada (*Input*=100%). Como control negativo se realizó una inmunoprecipitación *Mock* sin el uso de un anticuerpo específico.

-Extracción de ARN y RT-PCR

La extracción de ARN de los embriones se realizó empleando el kit de extracción *Illustra RNAspin Mini* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue resuspendido en H₂O libre de RNAsa y su concentración fue medida usando un Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). El ARN fue conservado a -80°C.

La retrotranscripción del ARN extraído para obtener el ADNc se realizó empleando el kit *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención del ADNc se empleó, durante el

proceso de retrotranscripción, 1µg de ARN total y se llevó a cabo en un volumen final de 20µl.

-PCR cuantitativa a tiempo real

Los análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real fueron realizados a partir de ADN previamente obtenido o ADNc previamente retrotranscrito en presencia de *SYBR GREEN* (Roche) en un equipo *Roche Lightcycler 480*. Se empleó el kit *Lightcycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I* siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche).

Las parejas de oligonucleotidos empleadas durante los ensayos de cuantificación fueron las siguientes:

-260fw: 5'-TGGAAATTTAATTACGAGCT-3'
-260rv: 5'-ATGAAACTGTGTTCAACAAT-3'
-359fw: 5'-GTTTTGAGCAGCTAATTACC-3'
-359rv: 5'-TATTCTTACATCTATGTGACC-3'
-361fw: 5'-TGAGCTCGTAATAAAATTTCC-3'
-361rv: 5'-TCAACGATGTATGACATTCC-3'
-actinafw: 5'-CACGGTATCGTGACCAACTG-3'
-actinarv: 5'-GCCATCTCCTGCTCAAAGTC-3'
-ADNr_{fw}: 5'-GGC TAA AAC CAA GCG ATC GC-3'
-ADNr_{rv}: 5'-TTT TCG TCA CTA CCT CCC CG-3'
-1360fw: 5'-TGTATCGTTTTTAAAAAATTGTC-3'
-1360rv: 5'-GTGGACCTGTAATATATGCTCT-3'
-H23fw: 5'-CCAAGTTGGCCAGTTTTGAT-3'
-H23rv: 5'-AGTTCAAGCCCGGGTATTCT-3'
-labialfw: 5'-GGCGGGAAGTGCCCCATCCCAAC-3'
-labialrv: 5'-CGCGTCAAGTAGCGATTGAAGTGG-3'
-Rpd3fw: 5'-CGGAGAGTATTTCCCGGG-3'
-Rpd3rv: 5'-GCCGGCTGGAATGTTTCC-3'
-Su(var)3-9fw: 5'-GCCGCCCAAAGGAGAGTACG-3'
-Su(var)3-9rv: 5'-CTCCATTTCCGGCGCAGTCGG-3'
-Su(var)3-3fw: 5'-ATCACCCGCCGTCCGGCATTGTCAGC-3'
-Su(var)3-93rv: 5'-GGCGGTGTCTCCACTTCCACTAGGC-3'

La cuantificación relativa a partir de los datos de expresión génica fue llevada a cabo mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001). Los datos obtenidos fueron normalizados en base a la expresión del gen de la actina (*ac5C*). Este gen mantiene estables y constantes sus niveles de expresión tanto en ausencia como en presencia de Hth.

La comparación de los niveles de ADN tratados mediante DNAsa I fue realizada en base a la variación de los C_t obtenidos (ΔC_t).

La cuantificación absoluta de la cantidad de ADN inmunoprecipitado mediante los ensayos de CHIP fue llevada a cabo realizando la extrapolación de los C_t obtenidos con una recta patrón resultante de la cuantificación de una dilución seriada de ADN genómico de concentración conocida.

8-APÉNDICE BIBLIOGRÁFICO

- Abu-Shaar, M., Mann, R. S. (1998).** Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development*; 125: 3821-30.
- Abu-Shaar, M., Ryoo, H. D., Mann, R. S. (1999).** Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.*; 13: 935-45.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., et al. (2000).** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*; 287, 2185-95.
- Aldaz, S., Morata, G., Azpiazu, N. (2005).** Patterning function of homothorax/extradenticle in the thorax of *Drosophila*. *Development*; 132: 439-46.
- Azpiazu, N., Morata, G. (1998).** Functional and regulatory interactions between Hox and extradenticle genes. *Genes Dev.*; 12: 261-73.
- Azpiazu, N., Morata, G. (2000).** Function and regulation of homothorax in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Development*; 127: 2685-93.
- Azpiazu, N., Morata, G. (2002).** Distinct functions of homothorax in leg development in *Drosophila*. *Mech. Dev.*; 119: 55-67.
- Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., Kouzarides, T. (2001).** Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*; 410: 120-24.
- Bayne, E. H., White, S. A., Kagansky, A., Bijos, D. A., Sanchez-Pulido, L., Hoe, K. L., Kim, D. U., Park, H. O., Ponting, C. P., Rappsilber, J., Allshire, R. C. (2010).** Stc1: a critical link between RNAi and chromatin modification required for heterochromatin integrity. *Cell*; 140: 666-77.
- Bessa, J., Gebelein, B., Pichaud, F., Casares, F., Mann, R. S. (2002).** Combinatorial control of *Drosophila* eye development by eyeless, homothorax, and teashirt. *Genes Dev.*; 16: 2415-27.

- Blower, M. D., Karpen, G. H.** (2001). The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat. Cel. Biol.*; 3: 730-9.
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248-54.
- Brockmann, A., Domínguez-Cejudo, M. A., Amore, G., Casares F.** (2011). Regulation of ocellar specification and size by twin of eyeless and homothorax. *Dev. Dyn.*; 240: 75-85.
- Brower-Toland, B., Findley, S. D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S. C., Lin, H.** (2007). *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes Dev.*; 21: 2300-11.
- Brown, S. W.** (1966). Heterochromatin. *Science*; 151: 417-425.
- Bulut-Karslioglu, A., Perrera, V., Scaranaro, M., de la Rosa-Velazquez, I. A., van de Nobelen, S., Shukeir, N., Popow, J., Gerle, B., Opravil, S., Pagani, M., Meidhof, S., Brabletz, T., Manke, T., Lachner, M., Jenuwein, T.** (2012). A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 19: 1023-30.
- Bürglin, T. R.** (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.*; 25: 4173-80.
- Casares, F., Mann, R. S.** (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature*; 392: 723-6.
- Casares, F., Mann, R. S.** (2000). A dual role for homothorax in inhibiting wing blade development and specifying proximal wing identities in *Drosophila*. *Development*; 127: 1499-508.

- Cléard, F., Delattre, M., Spierer, P.** (1997). SU(VAR)3-7, a *Drosophila* heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation. *EMBO J.*; 16: 5280-8.
- Czermin, B., Schotta, G., Hülsmann, B. B., Brehm, A., Becker, P. B., Reuter, G., Imhof, A.** (2001). Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.*; 2: 915-9.
- Delattre, M., Spierer, A., Tonka, C. H., Spierer, P.** (2000). The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*: interaction between the heterochromatin-associated proteins Su(var)3-7 and HP1. *J. Cell Sci.*; 113: 4253-61.
- Dernburg, A. F., Sedat, J. W., Hawley, R. S.** (1996). Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell*; 86: 135–146.
- Deshpande, G., Calhoun, G., Schedl, P.** (2005). *Drosophila* argonaute-2 is required early in embryogenesis for the assembly of centric/centromeric heterochromatin, nuclear division, nuclear migration, and germ-cell formation. *Genes Dev.*; 19: 1680-85.
- Dobie, K. W., Hari, K. L., Maggert, K. A., Karpen, G. H.** (1999). Centromere proteins and chromosome inheritance: a complex affair. *Curr. Opin. Genet. Dev.*; 9: 206-17.
- Dong, P. D., Dicks, J. S., Panganiban, G.** (2002). Distal-less and homothorax regulate multiple targets to pattern the *Drosophila* antenna. *Development*; 129: 1967-74.
- Ebert, A., Lein, S., Schotta, G., Reuter, G.** (2006). Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res*; 14:377-92.
- Eissenberg, J. C., Elgin, S. C.** (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*; 10: 204-10.
- Eissenberg, J. C., James, T. C., Foster-Hartnett, D. M., Hartnett, T., Ngan, V., Elgin, S. C.** (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; 87: 9923-27.

-Eissenberg, J. C., Morris, G. D., Reuter, G., Hartnett, T. (1992). The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics*; 131: 345-52.

-Ekwall, K. (2004) The RITS complex-A direct link between small RNA and heterochromatin. *Mol. Cell*; 13: 304-5.

-Fagegaltier, D., Bougé, A. L., Berry, B., Poisot, E., Sismeiro, O., Coppée, J. Y., Théodore, L., Voinnet, O., Antoniewski, C. (2009). The endogenous siRNA pathway is involved in heterochromatin formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 106: 21258-63.

-Fernández-Piqueras, J., Fernández-Peralta, A. M., Santos-Hernández, J, González-Aguilera, J. J. (2002). Genética. *Editorial Ariel Cioencia*.

-Finch JT, Lutter LC, Rhodes D, Brown RS, Rushton B, Levitt M, Klug A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*;269:29-36.

-Fischle, W., Wang, Y., Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.*; 15: 172-83.

-Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D., Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.*; 17: 1870-81.

-Festenstein, R., Chan, J. P. (2012). Context is everything: activators can also repress. *Nat. Struct. Mol. Biol.*; 19: 973-5.

-Flybase. Consultado en julio, 2013.

-Foe, V. E. and Alberts, B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J Cell Sci*; 61, 31-37.

-Foe, V. E., Garret, M., Odell, M., Edgar, B. A. (1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. *In the development of Drosophila*

melanogaster, vol. 1 (ed. M. Bate and A. Martinez-Arias). Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1, 149-300.

-Folco, H. D., Pidoux, A.L., Urano, T., Allshire, R. C. (2008). Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science*; 319: 94-7.

-Fujioka, M., Gebelein, B., Cofer, Z. C., Mann, R. S., Jaynes, J. B. (2012). Engrailed cooperates directly with Extradenticle and Homothorax on a distinct class of homeodomain binding sites to repress sloppy paired. *Dev. Biol.*; 366: 382-92.

-Geerts, D., Schilderink, N., Jorritsma, G., Versteeg, R. (2003). The role of the MEIS homeobox genes in neuroblastoma. *Cancer Lett.*; 197: 87-92.

-Gehrin WJ. (1992) The homeobox in perspective. *Trends Biochem Sci*; 17(8): 277-80.

-Gehrin WJ. (1993) Exploring the homeobox. *Gene*; 135(1-2): 215-21.

-Gilbert, S. F. (2003). Developmental Biology. *Sinauer Associates, INC. Publishers.*

-González-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martínez-A, C., Mann, R. S., Morata, G. (1998). Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature*; 394: 196-200.

-Grewal, S. I., Elgin, S. C. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.*; 12: 178-87.

-Grewal, S. I., Elgin, S. C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*; 447: 399-406.

-Grewal, S. I., Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.*; 8: 35-46.

-Grewal, S. I., Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*; 301: 798-802.

-Heine, P., Dohle, E., Bumsted-O'Brien, K., Engelkamp, D., Schulte, D. (2008). Evidence for an evolutionary conserved role of homothorax/Meis1/2 during vertebrate retina development. *Development*; 135: 805-11.

-Hsieh, J., Fire, A. (2000). Recognition and silencing of repeated DNA. *Annu. Rev. Genet.*;34: 187-204.

-Huang, X. A., Yin, H., Sweeney, S., Raha, D., Snyder, M., Lin, H. (2013). A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs. *Dev. Cell.*; 24: 502-16.

-Iotti, G., Longobardi, E., Masella, S., Dardaei, L., De Santis, F., Micali, N., Blasi, F. (2011). Homeodomain transcription factor and tumor suppressor Prep1 is required to maintain genomic stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 108: E314-22

-Irimia, M., Maeso, I., Burguera, D., Hidalgo-Sánchez, M., Puellas, L., Roy, S. W., Garcia-Fernández, J., Ferran, J. L. (2011). Contrasting 5' and 3' evolutionary histories and frequent evolutionary convergence in Meis/hth gene structures. *Genome. Biol. Evol.*; 3: 551-64.

-Jacobs, S. A., Taverna, S. D., Zhang, Y., Briggs, S. D., Li, J., Eissenberg, J. C., Allis, C. D., Khorasanizadeh, S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.*; 20: 5232-41.

-James, T. C., Eissenberg, J. C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A., Elgin, S. C. (1989). Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. *Eur. J. Cell Biol.*; 50: 170-80.

-James, T. C., Elgin, S. C. (1986). Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell Biol.*; 6: 3862-72.

-Jaquet, Y., Delattre, M., Spierer, A., Spierer, P. (2002). Functional dissection of the *Drosophila* modifier of variegation Su(var)3-7. *Development*; 129: 3975-82.

-Jaquet, Y., Delattre, M., Montoya-Burgos, J., Spierer, A., Spierer, P. (2006). Conserved domains control heterochromatin localization and silencing properties of SU(VAR)3-7. *Chromosoma*; 115: 139-50.

-Jaw, T. J., You, L. R., Knoepfler, P. S., Yao, L. C., Pai, C. Y., Tang, C. Y., Chang, L. P., Berthelsen, J., Blasi, F., Kamps, M. P., Sun, Y. H. (2000). Direct interaction of

two homeoproteins, homothorax and extradenticle, is essential for EXD nuclear localization and function. *Mech. Dev.*; 91: 279-91.

-Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*; 293: 1074-80.

-Jiang, W., Guo, X., Bhavanandan, V. P. (1998). Histone H2A.F/Z subfamily: the smallest member and the signature sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 245: 613-17.

-Kato, H., Goto, D. B., Martienssen, R. A., Urano, T., Furukawa, K., Murakami, Y. (2005). RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science*; 309: 467-9.

-Kornberg RD, Thomas JO. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*; 184:865-8.

-Kornberg RD. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*; 184:868-71.

-Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D. M., Bongiorno, S., Pranter, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Shi, W., Fundele, R., Singh, P. B. (2004). Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *J. Cell Sci.*; 117: 2491-501.

-Krogan, N. J., Keogh, M. C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O. W., Ding, H., Haw, R. A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., Richards, D. P., Wu, X., Emili, A., Hughes, T. R., Buratowski, S., Greenblatt, J. F. (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell*; 12: 1565-76.

-Kurant, E., Pai, C. Y., Sharf, R., Halachmi, N., Sun, Y. H., Salzberg, A. (1998). Dorsotons/homothorax, the Drosophila homologue of meis1, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS. *Development*; 125: 1037-48.

-Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*; 410: 116-20.

- Lachner, M., O'Sullivan, R. J., Jenuwein, T.** (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.*; 116: 2117-24.
- Lappin, T. R., Grier, D. G., Thompson, A., Halliday, H. L.** (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med. J.*; 75: 23-31.
- Lawrence, P. A.** (1992). The making of a fly: the genetics of animal design. *Blackwell Scientific Publications*.
- Leach, T. J., Mazzeo, M., Chotkowski, H. L., Madigan, J. P., Wotring, M. G., Glaser, R. L.** (2000). Histone H2A.Z is widely but nonrandomly distributed in chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*; 275: 23267-72.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*; 276: 565-70.
- Lin, H., Yin. H.** (2008). A novel epigenetic mechanism in *Drosophila* somatic cells mediated by Piwi and piRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*; 73: 273-81.
- Livak, K. J., Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*; 25: 402-8.
- Lopes, C. S., Casares, F.** (2010). hth maintains the pool of eye progenitors and its downregulation by Dpp and Hh couples retinal fate acquisition with cell cycle exit. *Dev. Biol.*; 339: 78-88.
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpiazu, N., Serrano, A., Morata, G., Martínez, C., Torres, M.** (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature*; 402: 425-9.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W. H., Sen, S., Wu, C.** (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*; 303: 343-48.
- Moazed, D.** (2001). Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell*; 8: 489-98.

- Moens, C. B., Selleri, L.** (2006). Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.*; 291: 193-206.
- Morgan, T. H.** (1910). Sex limited inheritance in *Drosophila*. *Science*; 32, 3.
- Moskow, J. J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I. O., Buchberg, A. M.** (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol. Cell Biol.*; 15: 5434-43.
- Motamedi, M. R., Verdel, A., Colmenares, S. U., Gerber, S. A., Gygi, S. P., Moazed, D.** (2004). Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. *Cell*; 119:789-802.
- Mukherjee, K., Bürglin, TR.** (2007). Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: new conserved motifs and cases of accelerated evolution.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., Grewal, S. I.** (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*; 292: 110-13.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genome Database.** Consultado en junio, 2013.
- Negre, N., Lavrov, S., Hennetin, J., Bellis, M., Cavalli, G.** (2006). Mapping the distribution of chromatin proteins by CHIP on CHIP. *Methods Enzymol.*; 420: 316-41.
- Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Mott, H. R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A. G., Murzina, N. V., Laue, E. D.** (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*; 416: 103-7.
- Pai, C. Y., Kuo, T. S., Jaw, T. J., Kurant, E., Chen, C. T., Bessarab, D. A., Salzberg, A., Sun, Y. H.** (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.*; 12: 435-46.

-Paro, R., Hogness, D. S. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 88: 263-7.

-Peifer, M., Wieschaus, E. (1990). Mutations in the *Drosophila* gene *extradenticle* affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes Dev.*; 4: 1209-23.

-Peng, H. W., Slattery, M., Mann, R. S. (2009). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA *bantam* in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev.*; 23: 2307-19.

-Peng, J. C., Karpen, G. H. (2007). H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. *Nat. Cell Biol.*; 9: 25-35.

-Peng, J. C., Lin, H. (2013). Beyond transposons: the epigenetic and somatic functions of the Piwi-piRNA mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.*; 25: 190-4.

-Peters, A. H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J. H., Jenuwein, T. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell.*; 12: 1577-89.

-Pichaud, F., Casares, F. (2000). *homothorax* and *iroquois-C* genes are required for the establishment of territories within the developing eye disc. *Mech. Dev.*; 96: 15-25.

-Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J Exp Biol.*; Jun;209(Pt 12):2362-7.

-Rangasamy, D., Berven, L., Ridway, P., Tremethick, D. J. (2003). Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *EMBO J.*; 22: 1599-1607.

-Rauskolb, C., Peifer, M., Wieschaus, E. (1993). *extradenticle*, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene *pbx1*. *Cell*; 74: 1101-12.

-Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*; 406: 593-9.

-Redon C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*; 12: 162-69.

-Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*; 11: 1114-25.

-Rice, J. C., Briggs, S. D., Ueberheide, B., Barber, C. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Shinkai, Y., Allis, C. D. (2003). Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol. Cell.*; 12: 1591-8.

-Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M., Mann, R. S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell*; 91: 171-83.

-Rodriguez-Collazo, P., Leuba, S. H., Zlatanova, J. (2009). Robust methods for purification of histones from cultured mammalian cells with the preservation of their native modifications. *Nucleic Acids Res.*; 37: e81.

-Rosales-Aviña, J. A., Torres-Flores, J., Aguilar-Lemarroy, A., et al. (2011). MEIS1, PREP1, and PBX4 are differentially expressed in acute lymphoblastic leukemia: association of MEIS1 expression with higher proliferation and chemotherapy resistance. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*; 30: 112

-Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schäfer, C., Phalke, S., Walther, M., Schmidt, A., Jenuwein, T., Reuter, G. (2007). Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol. Cell.*; 26:103-15.

-Ryoo, H. D., Mann, R. S. (1999). The control of trunk Hox specificity and activity by Extradenticle. *Genes Dev.*; 13: 1704-16.

- Ryoo, H. D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M., Mann, R. S.** (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development*; 126: 5137-48.
- Salvany, L., Aldaz, S., Corsetti, E., Azpiazu, N.** (2009). A new role for hth in the early pre-blastodermic divisions in drosophila. *Cell Cycle*; 8: 2748-55.
- Sánchez-Herrero, E., Vernos, I., Marco, R. and Morata G.** (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex. *Nature*; 313:108-13-
- Sanson B.** (2001). Generating patterns from fields of cells. Examples from *Drosophila* segmentation. *EMBO Rep.*; 2: 1083-8.
- Schneider, D.** (2000). Using *Drosophila* as a model insect. *Nature Reviews Genetics*; 1: 218-26.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., Reuter, G.** (2002). Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.*; 21: 1121-31.
- Schotta, G., Ebert, A., Dorn, R., Reuter, G.** (2003). Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin. Cell Dev. Biol.*; 14: 67-75.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., Jenuwein, T.** (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Dev.*; 18: 1251-62.
- Selker, E. U.** (1999). Gene silencing: repeats that count. *Cell*; 97: 157-60.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Bender, W., Kingston, R. E.** (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*; 98: 37-46.
- Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D., Hake, S.B.** (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.*; 2: 1445-57.

- Singh, A., Tare, M., Kango-Singh, M., Son, W. S., Cho, K. O., Choi, K. W.** (2011). Opposing interactions between homothorax and Lobe define the ventral eye margin of *Drosophila* eye. *Dev. Biol.*; 359: 199-208.
- Sontheimer, E. J., Carthew, R. W.** (2005). Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*; 122: 9-12.
- Soshnikova, N.** (2011). Dynamics of Polycomb and Trithorax activities during development. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*; 91: 781-7.
- Stein GS, Roberts RM, Davis JL, Head WJ, Stein JL, Thrall CL, Van Veen J, Welch DW.** (1975). Are glycoproteins and glycosaminoglycans components of the eukaryotic genome? *Nature*; 258:639-41.
- St Johnston, D.** (2002). The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet.*; 3: 176-88.
- Strahl, B. D., Allis, C. D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*; 403: 41-45.
- Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Moazed, D., Grewal, S. I.** (2005). RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 102: 152-7.
- Sun, F. L., Haynes, K., Simpson, C. L., Lee, S. D., Collins, L., Wuller, J., Eissenberg, J. C., Elgin, S. C.** (2004). cis-Acting determinants of heterochromatin formation on *Drosophila melanogaster* chromosome four. *Mol. Cell Biol.*; 24: 8210-20.
- Swaminathan, J., Baxter, E. M., Corces, V. G.** (2005). The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes Dev.*; 19: 65-76.
- Thorsteinsdottir, U., Kroon, E., Jerome, L., Blasi, F., Sauvageau, G.** (2001). Defining roles for HOX and MEIS1 genes in induction of acute myeloid leukemia. *Mol. Cell Biol.*; 21: 224-34.

- Tie, F., Furuyama, T., Prasad-Sinha, J., Jane, E., Harte, P. J.** (2001). The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development*; 128: 275-86.
- Ting, D. T., Lipson, D., Paul, S., Brannigan, B. W., Akhavanfard, S., Coffman, E. J., Contino, G., Deshpande, V., Iafrate, A. J., Letovsky, S., Rivera, M. N., Bardeesy, N., Maheswaran, S., Haber, D. A.** (2011). Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science*; 331: 593-6.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H. & Hurt, E. C.** (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*; 72: 443–457.
- Turner, B. M., Birley, A. J., Lavender, J.** (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell*; 69: 375-84.
- Usakin, L., Abad, J., Vagin, V. V., de Pablos, B., Villasante, A., Gvozdev, V. A.** (2007). Transcription of the 1.688 satellite DNA family is under the control of RNA interference machinery in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Genetics*; 176: 1343-9.
- Van Daal, A., Elgin, S. C.** (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell*; 3: 593-602.
- Van Daal, A., White, E. M., Gorovsky, M. A., Elgin, S. C.** (1988). *Drosophila* has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A.F/Z type. *Nucleic Acids Res.*; 16: 7487-97.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I., Moazed, D.** (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*; 303: 672-6.
- Volpe, T., Schramke, V., Hamilton, G. L., White, S. A., Teng, G., Martienssen, R. A., Allshire, R. C.** (2003). RNA interference is required for normal centromere function in fission yeast. *Chromosome Res.*; 11: 137-46.

- Wako, T., Houben, A., Furushima-Shimogawara, R., Belyaev, N. D., Fukui, K.** (2003). Centromere-specific acetylation of histone H4 in barley detected through three-dimensional microscopy. *Plant Mol Biol.*; 51: 533-41.
- Wassenegger, M.** (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell*; 122: 13-6.
- Wernet, M. F., Labhart, T., Baumann, F., Mazzoni, E. O., Pichaud, F., Desplan, C.** (2003). Homothorax switches function of Drosophila photoreceptors from color to polarized light sensors. *Cell*; 115: 267-79.
- Westhof, E., Filipowicz, W.** (2005). From RNAi to epigenomes: how RNA rules the world. *Chembiochem.*; 6: 441-3.
- Wu, J., Cohen, S. M.** (1999). Proximodistal axis formation in the Drosophila leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less. *Development*; 126: 109-17.
- Yeoh, E. J., Ross, M. E., Shurtleff, S. A., et al.** (2002). Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*; 1: 133-43.
- Yin, H., Lin, H.** (2007). An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in Drosophila melanogaster. *Nature*; 450: 304-8.
- Zhang, T., Zhou, Q., Pignoni, F.** (2011). Yki/YAP, Sd/TEAD and Hth/MEIS control tissue specification in the Drosophila eye disc epithelium. *PLoS One.*; 6: e22278.
- Zhang, Y., Lin, N., Carroll, P. M., Chan, G., Guan, B., Xiao, H., Yao, B., Wu, S. S., Zhou, L.** (2008). Epigenetic blocking of an enhancer region controls irradiation-induced proapoptotic gene expression in Drosophila embryos. *Dev. Cell*; 14: 481-93.

9-COMPENDIO DE ABREVIATURAS

- ADN**: ácido desoxirribonucleico
- ADNc**: ADN complementario
- ADNr**: ADN ribosómico
- ARN**: ácido ribonucleico
- ARNi**: ARN interferente
- ARNm**: ARN mensajero
- ATP**: adenosín trifosfato
- BSA**: del inglés *Bovine Serum Albumin*
- CID**: del inglés *Centromere Identifier Protein*
- DTT**: ditioneitol
- dsRNA**: ARN de doble cadena
- EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético
- EGTA**: ácido etilenglicoltetraacético
- exd**: gen *extradenticle*
- GFP**: del inglés *Green Fluorescent Protein*
- H3K9**: residuo 9 de lisina de la histona 3
- H4K12**: residuo 12 de lisina de la histona 4
- H4K20**: residuo 20 de lisina de la histona 4
- HDAC**: histona-desacetilasa
- HMT**: histona-metiltransferasa
- HP1**: *Heterochromatin associated protein*
- hth**: gen *homothorax*
- Kb**: mil pares de bases
- Mb**: millones de pares de bases
- nm**: nanómetros
- O/N**: del inglés *Over Night*
- PAGE**: del inglés Polyacrylamide gel electrophoresis
- pb**: pares de bases
- PBS**: tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffered Saline*
- PCR**: del inglés, *Polymerase Chain Reaction*
- PEV**: del inglés, *position-effect variegation*
- piRNAs**: ARN interferente corto asociado a la proteína Piwi
- qPCR**: PCR cuantitativa
- RITS**: del inglés *RNA-induced transcriptional silencing*
- RT-PCR**: del inglés *Reverse Transcriptase PCR*
- SDS**: dodecilsulfato sódico
- siRNAs**: del inglés *small interfering RNAs*

-TCA: ácido tricloroacético